

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno – matematički fakultet

Biološki odsjek

Ivana Sardelić

**Učinci hipertermije, citostatika cisplatine i propolisa na imunosne
odrednice u miša nositelja Erlichovog ascitesnog tumora**

Diplomski rad

Zagreb, 2009. godina

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za Animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka PMF – a, pod vodstvom Prof. dr. sc. Nade Oršolić, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja prof. biologije i kemije.

Zahvaljujem svojoj mentorici Prof. dr. sc., Nadi Oršolić na nesebičnoj pomoći i savjetima tijekom izrade rada.

Zahvaljujem svojoj obitelji na razumijevanju i potpori tijekom studiranja te svojim prijateljima na moralnoj podršci.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Diplomski rad

Prirodoslovno – matematički fakultet

Biološki odsjek

**UČINCI HIPERTERMIJE, CITOSTATIKA CISPLATINE I PROPOLISA NA IMUNOSNE
ODREDNICE U MIŠA NOSITELJA ERLICHOVOG ASCITESNOG TUMORA**

Ivana Sardelić

Zavod za Animalnu fiziologiju, Prirodoslovno – matematički fakultet,

Sveučilište u Zagrebu

Roosveltov trg 6, 10 000 Zagreb

Učinak hipertermičke kemoimunoterapije na imunosne odrednice u miša nositelja Erlichovog ascitesnog tumora istražili smo praćenjem hematoloških i imunosnih odrednica miša 3., 10. i 17. dana od unosa EAT stanica u peritonealnu šupljinu miša. Pratili smo ukupni broj leukocita, polimorfonuklearne leukocite, mononuklearne leukocite, ukupni broj eritrocita, koncentraciju hemoglobina, hematokrit, MCV, MCH, MCHC i ukupni broj trombocita. Miševe smo preventivno obradili *i.p.* pripravkom vodene otopine propolisa (VOP) u dozi 50 mg kg⁻¹ 7. i 3. dana prije *i.p.* unosa 2×10⁶ EAT stanica. Kemoterapiju (37 °C) i hipertermičku kemoterapiju (43 °C) s cisplatinom u dozi od 5 i 10 mg kg⁻¹ primjenili smo treći dan nakon unosa tumorskih stanica u peritonealnu šupljinu miševa.

Analizom rezultata zaključili smo da propolis i njegove flavonoidne sastavnice združeni s kemoterapeutcima mogu povećati protutumorski učinak kemoterapeutika, što sugerira moguću kliničku uporabu u cilju povećanja imunosti organizma te smanjenja štetnih učinaka kemoterapeutika na normalne stanice i tkiva.

(45 stranica, 2 slike, 6 tablica, 24 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici Prirodoslovno – matematičkog fakulteta, Marulićev trg 20/II, 10 000 Zagreb

Ključne riječi: propolis, cisplatina, Erlichov ascitesni tumor, imunosne odrednice, hipertermija

Voditelj: Dr. sc. Nada Oršolić, izv. prof.

Ocjenitelji: Dr. sc. Nada Oršolić, izv.prof.

Dr. sc. Antonija Hergold – Brundić, izv. prof.

Dr. sc. Biserka Prugovečki, doc.

Dr. sc. Ines Radanović, doc.

Zamjena: Dr. sc. Zoran Tadić, doc.

Rad prihvaćen: 9. rujna 2009.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Graduation Thesis

Faculty of Science

Department of Biology

**EFFECTS OF HYPERTHERMIA, CITOSTATIC CISPLATIN AND PROPOLIS ON
IMMUNE DETERMINANTS IN MICE BEARING ERLICH ASCITES TUMOR**

Ivana Sardelić

Department of Animal Physiology, Faculty of Science, University of Zagreb

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb

We were investigating the effect of hyperthermic chemoimmunotherapy on immune parameters in mice bearing Erlich ascites tumor by observing hematological and immune determinants in Swiss albino mice on the 3rd, 10th, and 17th day after inoculation of EAT cells into peritoneal cavity of the mice. We were monitoring the total number of leucocytes, polymorphonuclear leucocytes, mononuclear leucocytes, the total number of erythrocytes, the concentration of hemoglobin, hematocrit, MCV, MCH, MCHC and the total number of thrombocytes. Mice were preventively treated *i.p.* by water – soluble derivative of propolis (WSDP) at the dose of 50 mg kg⁻¹ on the 7th and 3rd day before *i.p.* EAT cells inoculation. Chemotherapy (37°C) and hypothermic chemotherapy (43°C) with cisplatin at the doses of 5 and 10 mg kg⁻¹ were given on the third day after the tumor cell inoculation into peritoneal cavity of mice.

The analysis of the results has led us to the conclusion that the combination of WSDP with chemotherapeutics could increase the antitumor potential of chemotherapeutic agents which suggests the benefits of potential clinical use in order to maximize immunity of organism and minimize harmful effects of chemotherapeutic agents on normal cells and tissues.

(45 pages, 2 figures, 6 tables, 24 references, original in Croatian)

The thesis is deposited in the Central biological library, Marulićev trg 20/II, Zagreb

Keywords: propolis, cisplatin, Erlich ascites tumor, immune determinants, hyperthermia

Supervisor: Dr. sc. Nada Oršolić, Assoc. Prof.

Reviewers: Dr. sc. Nada Oršolić, Assoc. Prof.

Dr. sc. Antonija Hergold – Brundić, Assoc. Prof.

Dr. sc. Biserka Prugovečki, Asst. Prof.

Dr. sc. Ines Radanović, Asst. Prof.

Substitute: Dr. sc. Zoran Tadić, Asst. Prof.

Thesis accepted: September 9th 2009.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. TUMOR	1
1.1.1. Osobitosti stanica tumora	1
1.1.2. Rast tumorskog čvora	2
1.1.2.1. Tumorska angiogeneza	2
1.1.2.2. Metastaziranje	3
1.1.3. Molekularna biologija tumora	4
1.1.4. Imunoreakcija na tumor	5
1.1.4.1. Tumorski antigeni	5
1.1.4.2. Imunosna otpornost na tumor	6
1.1.4.2.1. Stanična imunost	7
1.1.4.2.2. Humoralna imunost	7
1.1.4.3. Izmicanje tumora imunosnoj obrani	7
1.2. KEMOTERAPIJA	9
1.2.1. Citostatici	9
1.2.2. Cisplatina (cis-diamino-dikloroplatinum, cis-DDP)	11
1.3. BIOTERAPIJA (IMUNOTERAPIJA)	12
1.4. HEMATOPOETSKI SUSTAV	15
1.5. HIPERTERMIJA	16
1.5.1. Terapijski modaliteti hipertermije	16
1.5.2. Biološki učinci hipertermije	17
1.5.3. Faktori koji utječu na hipertermijski učinak	18
1.6. PROPOLIS	19
1.6.1. Što je propolis?	19
1.6.2. Fizikalna i kemijska svojstva propolisa	19
1.6.3. Biološka svojstva propolisa	20
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	24
3. MATERIJALI I METODE	25
3.1. MATERIJALI KORIŠTENI U ISTRAŽIVANJU	25

3.1.1. Pokusne životinje	25
3.1.2. Erlichov ascitesni tumor	25
3.1.3. Vodena otopina propolisa	25
3.1.4. Citostatik cisplatina	26
3.2. METODE KORIŠTENE U ISTRAŽIVANJU	26
3.2.1. Postupak sa životinjama	26
3.2.2. Intraperitonejska hipertermija	26
3.2.3. Analiza hematoloških parametara	26
4. REZULTATI	28
5. RASPRAVA	38
6. ZAKLJUČCI	42
7. LITERATURA	43

1. UVOD

1.1. TUMOR

1.1.1. Osobitosti stanica tumora

Normalni višestanični organizam visoko je socijalno organizirana nakupina stanica u kojoj se održava strogo dinamička ravnoteža između umiranja stanica i njihova obnavljanja. Stanice u organima i tkivima, propale zbog isteka životnoga vijeka, u pravilu se nadomještaju novima iste vrste, tako da broj i arhitektura ostaju nepromijenjeni.

Katkad se pojavi stanica koja više ne reagira na normalne mehanizme regulacije rasta i koja se nastavlja neobuzdano, autonomno, nesvrhovito dijeliti i tako njezini potomci postaju besmrtni. To su tumorske stanice koje se umnože u klon, klinički zamjetljiv kao **tumor** ili **neoplazma**. Kontaktna inhibicija i humoralni inhibitori rasta koji inače djeluju na zdravo tkivo ne djeluju na tumorsko. Kontaktna inhibicija je inhibicija koja koči mitozu, a uzrokovana je neposrednim dodirima sa stanicama. Humoralne inhibitore proizvode zrele stanice, koji su po kemijskom sastavu glikoproteini, a djeluju na nezrele stanice istog tkiva sprečavajući mitozu.

Proces nastajanja tumora naziva se karcinogeneza. Karcinogeneza je stupnjeviti proces, a središnji događaj je nesmrtno genetsko oštećenje. Genetsko oštećenje može biti stečeno djelovanjem okolišnih čimbenika ili može biti naslijeđeno još u zametku. Genetska hipoteza zloćudnih tumora uključuje mišljenje da je tumorska masa posljedica klonalnog bujanja jedne jedine stanice koja je pretrpjela genetsko oštećenje, tj. da su tumori monoklonalni. Iako je tumor u trenutku kliničkog dijagnosticiranja monoklonski, sadržava stanice koje su vrlo heterogene, što je rezultat brojnih mutacija koje se gomilaju.

Vjeruje se da je prvi korak u procesu nastajanja tumora, inicijacija tumora, rezultat mutacija specifičnih dijelova genoma koji su odgovorni za reprodukciju i rast stanica. Te genetičke promjene dovode do abnormalne proliferacije jedne jedine stanice, koja potom dovodi do prekomjernog rasta populacije tumorskih stanica. Progresija tumora se nastavlja nakupljanjem dodatnih mutacija u populaciji tumorskih stanica. Neke od njih, poput onih koji rezultiraju bržim rastom, dovode do selektivne prednosti stanice u kojoj su se pojavile i njezini potomci s vremenom postaju dominantna populacija u tumoru. Taj se proces zove klonska selekcija jer novi klon tumorskih stanica nastaje zbog bržeg rasta ili nekog drugog

svojstva (poput sposobnosti preživljavanja ili metastaziranja) koje mu omogućuje selektivnu prednost pred drugim stanicama. U tumorima je klonska selekcija stalno prisutna, tako da oni postupno rastu sve brže i postaju sve zloćudniji (Hausmann i Cooper, 2004).

Postanak tumora ne može se objasniti samo jednim uzročnikom, jer se zna da je nastanak tumora posljedica djelovanja više čimbenika. Tu se ubrajaju način života (prehrana, stres, pušenje i dr.), te razni čimbenici biološkog, kemijskog i fizičkog podrijetla. Tumor mogu izazvati razni kancerogeni agensi (policiklički ugljikovodici, aromatski imini, azo-boje i dr.), zračenje (UV-svijetlost, rentgenske zrake) te onkogeni virusi (HPV, Epstein-Barrov virus, hepatitis B virus)

Tumori se prema svojim osobitostima mogu podijeliti u dvije glavne skupine:

1. Dobroćudni ili benigni tumor je tumor čiji je rast ograničen na tkiva u kojima se razvija, a ne metastazira u druga tkiva i organe. Dobroćudni tumori su: adenomi, papilomi, polipi, ciste adenoma.
2. Zloćudni ili maligni tumori imaju sposobnost razaranja tkiva u kojem rastu, ali i sposobnost metastaziranja u okolna tkiva. Dije se na karcinome (zloćudne bolesti epitelnih stanica, 90%), sarkome (solidni tumori vezivnih tkiva – mišići, kosti, hrskavice; rijetki kod ljudi), leukemije i limfome (zloćudne bolesti hematopoetskih sustava i stanica imunostanica, 7%) (Kumar i sur. 2000)

1.1.2. Rast tumorskog čvora

Da bi se razvila klinička slika tumorske bolesti nije dovoljna samo pojava zloćudne bolesti. Naime, jednom stvorena tumorska stanica mora pronaći pogodan okoliš za razvoj u tumorski čvor. „Uspavane“ tumorske stanice mogu u tijelu opstati i desetljećima prije nego organiziraju svoju prokrvljenost i izraze svoj maligni fenotip.

1.1.2.1. Tumorska angiogeneza

Da bi nakupina tumorskih stanica u tkivu, u obliku kuglice promjera 1 do 2 mm, mogla dalje rasti, nužno je da organizira vlastitu prokrvljenost. Ona obavlja izmjenu tvari s okolišem jednostavnim difuzijom, koja je dostatna samo za sloj stanica blizu površine kuglice, dok one u središtu nekrotiziraju. Stanice se neprestano rađaju, „putuju“ u unutrašnjost i umiru. Iako sve imaju zajedničkog pretka, ipak su one genetski nestabilne i vrlo heterogene po svojim svojstvima, kao što su: veličina, oblik, brzina rasta, antigeničnost, osjetljivost na vanjske utjecaje, metastatski potencijal i dr. Upravo ta genska nestabilnost, koja traje tijekom

čitavoga života tumora, jest osnovni problem terapijskoga pristupa tumorima. Kad neke tumorske stanice zadobiju svojstvo lučenja čimbenika tumorske angiogeneze, on stimulira urastanje novih domaćinovitih kapilara u tumor. Tada tumor raste, agresivno infiltrirajući i destruirajući okolno zdravo tkivo (Hausmann i Cooper, 2004).

1.1.2.2. Metastaziranje

Pojavnost metastaze je složena i stupnjevita posljedica širenja maligna tumora na koje utječu svojstva domaćina tumora te osobitost samih tumorskih stanica. Raspored metastaza je uglavnom ovisan o histološkom tipu i smještaju primarnog tumora. Najčešće smještanje udaljene metastaze mnogih tipova tumora jest u najbližem kapilarnom području prolaska tumorske stanice nakon napuštanja primarnog tumora.

Tkiva sisavaca organizirana su u nizove „pretinaca“ odijeljenih međusobno dvjema vrstama izvanstaničnog tkiva: bazalnim membranama i intersticijskim vezivnim tkivom. Bazalna membrana je u cjelovitosti gusta mreža kolagena, glikoproteina i proteoglikana, koja normalno ne sadrži veće pore kroz koje bi mogle pasivno „procuriti“ tumorske stanice. Dakle, njihova invazija kroz bazalnu membranu mora biti aktivan proces. Bazalna membrana je vrlo bitna jer tumorske stanice moraju proći kroz nju kako bi mogla napasti živce, mišiće i drugo.

Invazija tumorskih stanica u izvanstanično tkivo može se podijeliti u tri stupnja. Prvi stupanj je prijanjanje tumorske stanice na površinu bazalne membrane. Posrednici ovog procesa su površinski receptori za integrin na tumorskim stanicama i ne-integrinske tvari koje se vežu za glikoproteine kao što je laminin, fibronektin i kolagen tipa IV.

Drugi stupanj uključuje razgradnju bazalne membrane i intersticijskog vezivnog tkiva. Tumorske stanice same izlučuju proteolitičke enzime, ili pobuđuju stanice domaćina da stvaraju proteaze. U skladu s time se na bazalnoj membrani pojača aktivnost velikog broja proteolitičkih enzima (kolagenaze, plazminogen aktivator i elastaze). Tako je primjerice u tom području pojačana aktivnost aktivatora plazminogena koji djeluje na plazminogen u krvi, stvarajući plazmin. Ovi enzimi izravno i neizravno djeluju na kaskade aktivacije drugih enzima, razarajući na taj način sastavnice bazalne membrane, primjerice kolagen tipa IV, laminin, fibronektin i proteoglikanske sulfate.

Treći stupanj invazije tumorske stanice obuhvaća njezin prolaz kroz rupu u bazalnoj membrani, nastalu proteolizom. Kada se nađe u krvnom optjecaju tumorske stanice stvaraju embrole nakupljanjem i pričvršćenjem za leukocyte u krvi, posebno za trombocyte;

nakupljanjem tumorske stanice na taj način budu donekle zaštićene od djelovanja antitumorskih stanica domaćina. Izlaženje iz krvne žile slobodnih tumorskih stanica ili embola uključuje pričvršćivanje za endotel krvne žile, nakon čega slijedi izlazak kroz bazalnu membranu mehanizmima sličnim onima koji djeluju pri invaziji, te nakon toga slijedi napad na ostala tkiva i organe. Nastala metastaza i sama može biti nositeljem novog procesa stvaranja metastaze, uvećavajući na taj način razinu rasapa malignih stanica (Turić i sur. 1996).

1.1.3. Molekularna biologija tumora

Ispitivanje i utvrđivanje genetskog oštećenja u tumorskim stanicama danas zauzima središnje mjesto u istraživanju malignih bolesti. Ta su oštećenja, najčešće recesivne i dominantne mutacije, veliki rearanžmani DNA i točkaste mutacije, značajna za brojne maligne tumore ljudi i životinja, a pridonose drastičnim promjenama u ispoljavanju određenih gena i/ili promjenama njihovih biokemijskih funkcija.

Analize oštećenja genoma u tumorskim stanicama upozorile su na postojanje skupine gena za koje se drži da sudjeluju u nastanku i progresiji tumora, a zovu se onkogeni i tumor supresorski geni. Skupina tih gena sastavni je dio genoma svake eukariotske stanice te u normalnim okolnostima sudjeluju u regulaciji staničnog ciklusa i diferencijaciji.

- **ONKOGENI** su mutirani ili oštećeni protoonkogeni u tumorskim stanicama.

Protoonkogeni su normalna varijanta onkogeni. Oni čine skupinu od stotinjak gena koji u normalnoj stanici sudjeluje u važnim staničnim funkcijama vezanim za rast i diferencijaciju stanice. Protoonkogeni kodiraju proteine, koji mogu biti faktori rasta, receptori faktora rasta, enzimi, proteini koji vežu DNA, ili pak transkripcijski faktori.

Mehanizmi koji sudjeluju u aktivaciji onkogeni su: mutacija, translokacija i amplifikacija.

Kad je riječ o mutacijama, najčešće su *točkaste mutacije*, pri čemu se jedan nukleotid zamjeni drugim, što rezultira najčešće kodiranjem pogrešnog proteina. Točkasta mutacija jednog nukleotida je dovoljna da posve poremeti njegovu funkciju.

Sljedeći mehanizam aktivacije onkogeni je *translokacija*, tj. premještanje dijelova kromosoma i spajanje s drugim. Točke loma zahvaćaju ona područja koja se aktivno prepisuju, uključujući i onkogene. Pri tome se cijeli onkogen ili samo njegov mali dio

premješta u blizinu drugog gena ili njegove regulacijske domene. Posljedica toga može biti gubitak regulacijskog slijeda onkogen, onkogen može doći pod kontrolu novih transkripcijskih elemenata ili se može spojiti s novim genom i oblikovati novi, kimerički gen, koji se aktivno prepisuje. Kromosomske translokacije često su prisutne u određenim vrstama leukemija i limfoma.

Čest mehanizam aktivacije onkogen je i *amplifikacija* koja označava prekomjernu aktivnost nekog gena. Jedan od mogućih mehanizama amplifikacije je retroviralna insercija. Naime, retrovirus se može nasumično ugraditi u genom domaćina. Eksperimentalno je dokazano da retrovirusna ugradnja u blizini promotora gena *myc* može od relativno mirnog gena stvoriti prekomjerno aktiviran gen, što rezultira velikom količinom *myc*-proteina (Šamija i sur., 2004).

- **TUMOR-SUPRESORSKI GENI** kodiraju proteine koji inhibiraju stanični ciklus i sudjeluju u nadzoru popravka oštećenja DNA. Funkcija i/ili struktura tih gena vrlo je često izgubljena ili promijenjena u stanicama raka. S obzirom na to da su proteinski regulatori supresorskih gena negativni regulatori stanične proliferacije, gubitak njegove ekspresije u stanicama tumora vodi k jačoj proliferaciji stanica, što ubrzava razvoj zloćudnog tumora (Šamija i sur., 2004).

1.1.4. Imunoreakcija na tumor

1.1.4.1. Tumorski antigeni

Proučavanje imunosne reakcije na maligni tumor i eventualna primjena imunoterapije tumora temelji se na pretpostavci da tumori na svojoj površini iskazuju molekule koje imunosni sustav prepoznaje kao tuđe i na koje reagira imunosnom reakcijom. Te molekule općenito se nazivaju **tumorskim antigenima**. Oni su po kemijskom sastavu glikoproteini nastali preradbom tumorskih bjelančevina koji se limfocitima T predaju vezani za molekule MHC-I ili MHC-II. Prema smještaju mogu se podijeliti na antigene na staničnoj površini, antigene u unutrašnjosti stanice i antigene koje tumorske stanice otpuštaju u okolinu.

Definirane su dvije vrste tumorskih antigena: tumorski specifični antigeni (TSA, prema engl. *tumour-specific antigens*) i tumoru pridruženi antigeni (TAA, prema engl. *tumour-associated antigens*).

- **Tumorski specifični antigeni (TSA)** ne nalaze se ni na kojoj normalnoj stanici, tj. doista su specifični za tumor. Oni mogu nastati zbog mutacije u tumorskim stanicama,

koje zatim proizvode promijenjene stanične bijelančevine. One se u citosolu prerađuju i kao novi peptid pridružuju molekulama MHC-I, pa mogu potaknuti staničnu imunost.

- **Tumoru pridruženi antigeni (TAA)** nisu novi domaćini, tj. nisu isključivo vezani za tumorske stanice, nego se nalaze na nekim stanicama embrijskog tkiva, na stanicama za vrijeme virusne infekcije, ili pak i u normalnim stanicama, ali u krajnje niskoj koncentraciji. Tumorski antigeni (TAA ili TSA) koji mogu izazvati transplatacijsku reakciju odbacivanja tumora, nazivaju se transplatacijskim tumorskim antigenima (TATA, prema eng. *tumour-associated transplantation antigens*) ili antigenima odbacivanja tumora (TRA, prema engl. *tumour rejection antigens*).

1.1.4.2. Imunosna otpornost na tumor

Limfociti T i B su jedine imunosne stanice koje imaju specifične receptore za antigen, pa stoga samo oni mogu specifično prepoznati i reagirati na neki antigen. Među limfocitima T dvije subpopulacije stanica mogu istodobno reagirati na antigen: limfociti koji iskazuju molekulu CD4 (limfociti CD4⁺) i limfociti koji iskazuju molekulu CD8 (limfociti CD8⁺), premda često dominira reakcija jedne ili druge subpopulacije.

Osim što imaju drukčije građene receptore za antigen, limfociti T i B prepoznaju antigen na različiti način. Limfociti B u načelu prepoznaju slobodan (topljiv) antigen koji se izravno veže na njihove receptore, dok limfociti T ne mogu prepoznati slobodan antigen nego samo antigen koji je predodčen na membrani drugih stanica. Nadalje, limfociti T ne prepoznaju intaktni preoteinski antigen, nego peptid(e) koji nastanu razgradnjom tog antigena u stanici koja ga predodčuje.

U reakciji na tumorske stanice uključeni su nespecifični oblici imunosti kao i oba oblika specifične imunosti: stanični i humoralni. Stanična imunost uključuje citotoksično djelovanje limfocita T, stanica NK, makrofaga, monocita, mastocita, eozinofila, pa i drugih polimorfonuklearnih leukocita. Humoralna imunost čini čitav spektar protutijela različitih razreda i podrazreda, koja u reakciji s površinskim tumorskim antigenima mogu u različitim uvjetima uzrokovati cijeli niz konačnih učinaka: od brzog potpunog uništenja tumorskih stanica do promjene stanične površine koja zaštićuje tumor. Posebno se snažna imunost razvija protiv virusa koji uzrokuju tumore, a ne protiv samih tumorskih stanica.

1.1.4.2.1. Stanična imunost

- **Citotoksični limfociti T** mogu pri izravnom dodiru uništiti tumorsku stanicu, a mehanizam ubijanja jednak je mehanizmu drugim oblicima stanične imunosti. Limfociti T CD8⁺ prepoznaju tumorske antigene predočene u sklopu molekule MHC-I. Na žalost brojni tumori slabo izražavaju MHC-I pa to ograničava ulogu citotoksičnih limfocita. Sposobnost ubijanja imaju senzibilizirani limfociti iz imuniziranih davalaca, ali i iz nosilaca progresivnog tumora. Senzibilizirani limfociti T, nadalje u dodiru s antigenom otpuštaju niz tvari (citokini) koje imaju različite važne biološke učinke. Na žalost, tumori, za razliku od bakterija ili virusa, ne izazivaju pojavu protuupalnih citokina i kemokina koji su potrebni za suradnju predočnih stanica i limfocita T za specifični antigen.
- **Stanice NK** mogu ubiti tumorske stanice pri izravnom dodiru, ali bez prethodne senzibilizacije. Nakon što se prikvači za tumorsku stanicu, stanica NK otpušta neke topljive čimbenike (perforine, lizolecitin, proteaze), koji uzrokuju njezinu lizu. Sve tumorske stanice nisu podjednako osjetljive na lizu posredovanu stanicama NK. Brojne su tvari koje potiču aktivnost stanica NK. Najvažniji je interferon koji ne povećava samo njihovo djelovanje već djeluje i kao središnji regulator njihovih funkcija. IL-2 također povećava njihovu aktivnost. Sve je raširenije mišljenje da je važna uloga stanica NK u sprječavanju nastanka i rasta primarnih tumora.
- **Makrofazi i monociti** također su aktivni sudionici u aferentnom i eferentnom dijelu imunoreakcije na tumor. Protutumorska aktivnost makrofaga temelji se na litičkim enzimima i metabolitima reaktivnoga kisika i dušikova oksida.

1.1.4.2.2. Humoralna imunost

Humoralna imunost ima u otpornosti na tumor ulogu koja nije jednoznačna i zbog toga ju je teško općenito definirati. Dok su svi tumori uglavnom osjetljivi na efektore stanične imunosti, osjetljivost na protutijela slaba je i različita. Protutijela mogu nakon vezanja s tumorskom stanicom učiniti ovu podložnu lizi, posredovanoj stanicama NK ili makrofagima (stanična citotoksičnost ovisna o protutijelima).

1.1.4.3. Izmicanje tumora imunosnoj obrani

Čak kad se i u domaćinu pokrene imunosni odgovor protiv tumora, ipak je najčešći prirodni tijek tumorske bolesti progresivan rast tumora i smrt domaćina. Predloženo je mnogo hipoteza koje nastoje objasniti da tumor raste unatoč postojanju protutumorske reakcije.

Slaba imunogeničnost tumorskih antigena ili nedostatak molekula MHC-I može omogućiti tumoru da nezamijećeno izmakne imunosnom nadzoru.

Imunoselekcija pretpostavlja da tumorske stanice osjetljive na imunološki napad propadaju, dok u tumoru prevladavaju otporne stanice

Antigenska modulacija jest pojava reverzibilnoga nestanka tumorskih antigena s površine stanica (npr. antigena TL u leukemija), ako su one izložene protutijelima. Sve dok postoje citotoksična protutijela u okolišu stanice, leukemije TL ne izražavaju svoje antigene.

Nedostatak drugog signala, potrebnog za aktivaciju limfocita T mogao bi također biti uzrokom izbjegavanja imunoreakcije.

Otpuštanje antigena u izvanstaničnu tekućinu mnogo je izraženije u tumorskih stanica nego u normalnih. Međutim, za letalno djelovanje protutijela ili citotoksičnih stanica na tumorsku stanicu potrebna je određena lokalna stabilnost i gustoća tumorskih antigena na površini. Ako se ti antigeni neprestano otpuštaju, oko tumora se stvara lokalna „dimna zavjesa“.

Teorija „prošuljavanja“ kroz imunosnu obranu prepostavlja da je u početku broj tumorskih stanica premalen da svojim antigenima stimulira imunosni sustav, a poslije, kad je količina antigena dostatna da izazove imunoreakciju, tumor je već uspostavljen.

Imunosna nereaktivnost može biti uzrokom nesmetanoga tumorskoga rasta. Tolerancija se pojavljuje kod životinja kao specifična imunotolerancija stečena u neonatalno doba prema vertikalno prenesenim onkogeničnim virusima, koji kasnije mogu izazvati tumor. Tolerancija se može razviti i zbog neprimjerenog predočenja tumorskih antigena. Drugi oblik imunosne neaktivnosti jest nespecifična imunodeficijencija koja može biti prirodna, ijetrogena ili uzrokovana tvarima koje izlučuju tumori.

Imunoprivilegirana mjesta neka su mjesta u organizmu koja nisu dostatno pod nadzorom imunosnoga sustava (npr. mozak), pa mogu tumorima pružiti utočište.

Teorija blokadnih čimbenika još je jedno od objašnjenja kako tumor izmakne obrani. Naime, nakon otkrića da se protiv tumorskih antigena mogu proizvesti protutijela, nastojalo se zaštititi životinje od tumora prijenosom već gotovih protutijela, međutim ona su umjesto zaštite izazvala pospješenje rasta tumora. Serum nosioca progresivnoga tumora

može *in vitro* blokirati staničnu citotoksičnost, dok serum organizma s regresivnim tumorom nema to djelovanje (Andreis i sur., 2004).

1.2. KEMOTERAPIJA

Kemoterapija je jedan od oblika liječenja organizma sa zloćudnim tumorom. To je postupak liječenja kod kojeg se primjenjuje neko kemijsko sredstvo (citostatik) koje izravno ubija ili oštećuje zloćudne stanice koje napadaju ljudski ili životinjski organizam.

Termin kemoterapija potječe od početka stoljeća, od Paula Ehlicha a uporabljen je za liječenje zaraznih bolesti kemijskim sredstvima. Povijest moderne kemoterapije počinje 1942. godine kada su Gilman i Philips na sveučilištu Yale započeli prvi klinički pokus liječenja zloćudnih limfoma dušikovim plikavcem.

1.2.1. Citostatici

Citostatici (antineoplastici) su kemijski spojevi koji interferiraju metabolizmom stanice, sprječavaju njen rast inhibicijom enzimskih sustava, oštećuju staničnu jezgru i koče diobu stanice. Njihovo djelovanje usmjereno je na tumorske stanice i narušavanjem njihovog staničnog ciklusa sprječavaju rast ili izazivaju smrt tih stanica u fazi aktivnog rasta. Kako bi se u što kraćem vremenu postigao najbolji terapijski učinak primjenjuju se kombinacije različitih citostatika čime se postiže sinergistički učinak, brže i selektivnije citotoksično djelovanje na tumorske stanice, a smanjuje se i mogućnost rezistencije tumora na neki citostatik.

U liječenju tumora i njihovih metastaza najčešće se primjenjuje združeno liječenje koje uključuje kirurško liječenje, terapiju citostaticima, imunoterapiju i radioterapiju jer se potpuni terapijski učinak rijetko postiže primjenom samo jedne metode.

U suvremenoj terapiji zloćudnih tumorskih bolesti danas se upotrebljava više od pedeset vrsta citotoksičnih lijekova. Razlikuju su prema kemijskoj strukturi, prema podrijetlu i prema mehanizmu djelovanja. Uobičajeno je da se citostatici dijele u pet skupina prema njihovom kemijskom sastavu i mehanizmu djelovanja, pa govorimo o alkilirajućim sredstvima, antimetabolitima, antitumorskim antibioticima, biljnim alkaloidima i skupini ostalih, različitih citostatika.

Alkilirajuća sredstva su najbrojniji razred. Oni su polifunkcionalni spojevi koji u fosfatnim, amino, hidroksilnim, sulf-hidrilnim, karboksilnim i imidazolskim grupama

vodikove atome zamjenjuje alkilnim radikalima. U neutralnim ili blago zakiseljenim medijima kao što su tjelesne tekućine ti spojevi ioniziraju, pozitivno nabijeni ioni vežu se na nuklearne proteine, a najčešće mjesto vezivanja je na N-7 poziciji gvanina. Alkilacija dovodi do raspada imidazolskog prstena gvanina, abnormalnog sparivanja baza, čvrstog kovalentnog vezivanja unutar istog ili između različitih lanaca DNA, depurinacije DNA, onemogućavanja replikacije DNA i transkripcije RNA, te uništenja funkcije nukleinskih kiselina. Neki od spojeva koji spadaju u ovu grupu su: biskloretilamin (dušikovi plikavci), alkil alkon sulfonati, ciklofosfamid, cisplatin, karboplatin, derivati nitrozoureje, melfalan, busulfan, klorambucil i dr.

Antimetaboliti su drugi po brojnosti razred niskomolekularnih spojeva koji remete fiziološke, a posebno procese bitne za rast zloćudnih stanica. Njihova je djelotvornost utemeljena na strukturnoj, ali ne i funkcionalnoj sličnosti sa spojevima koji imaju važnu fiziološku ulogu. Oni u staničnim procesima zamjenjuju normalne metabolite i vežući se na važne enzime onemogućuju njihovu funkciju u sintezi nukleinskih kiselina ili budu ugrađeni u te makromolekule, primjerice DNA, dovodeći do nastanka nukleinskih kiselina s pogrešnim kodom, što onemogućuje daljnji rast stanice i dovodi do njezine smrti. Najviše se koriste analozi metabolita nukleinskih kiselina, purinskih i pirimidinskih baza (metotreksat, edatreksat, aminopterin, citarabin, 5-fluorouracil, floksouridin, 5-merkaptopurin, tiogvanin, pentostatin, kladribin i fludarabin)

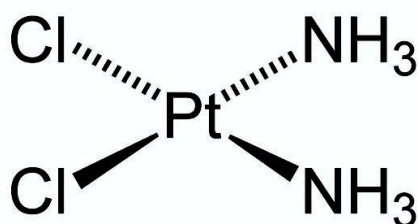
Protutumorski antibiotici su skupina različitih spojeva svrstanih u isti razred jer su dobiveni na način sličan dobivanju protubakterijskih antibiotika. Temeljne supstance su proizvod kultura različitih gljivica *Streptomyces species* koje su na različite načine modificirane. Mehanizam djelovanja je kočenje enzima topoizomerase II, što sprječava popravak lomova u DNA nastalih za vrijeme sinteze novih lanaca DNA i onemogućava odvajanje novih lanaca matične DNA. Toj skupini pripadaju: doksorubicin, epirubicin, idarubicin, bleomicin, mitomicin C, aktinomicin-D i dr.

Biljni alkaloidi su razred supstancija različitog mehanizma djelovanja kojima je zajedničko da su dobiveni iz različitih biljaka. Tom razredu pripadaju alkaloidi vinkristin, vinblastin te njihovi derivati vindezin, vinorelbin i vinzolidin, koji su dobiveni iz biljke *Vinca rosea*. Njihov mehanizam djelovanja je da se vežući na tubulin sprječavaju stvaranje diobenog vretena i na taj način zaustavljaju stanice u metafazi mitoze i u G₂-fazi staničnog ciklusa. U drugom podrazredu su derivati podofilotoksina, ekstrakti korijena sjevernoameričke biljke

Podophyllum peltatum slične našoj žutiki. Epopodofilotoksinski preparati su etopozid i tenipozid čiji je mehanizam djelovanja kočenje enzima topoizomeraze II što onemogućava popravak lomova na lancima DNA nastalih za vrijeme sinteze novih lanaca DNA. Treću skupini čine ekstrakti kore ili iglice drveća iz porodice tisa (*Taxus*), a nazivaju se takseni. To su paklitaksel i docetaksel koji onemogućuju stvaranje diobenog vretena od tubulina. U četvrtoj skupini se nalaze semisintetički derivati kamptotekina topotekan i irinotekan. Kamptotekin je ekstrakt kineskog drveta *Camptotheca acuminata* a mehanizam djelovanja je kočenje enzima topoizomeraze I što onemogućava popravak lomova nastalih u pojedinačnim lancima DNA i RNA (Turić i sur., 1996).

1.2.2. Cisplatina (cis-diamino-dikloroplatinum, cis-DDP)

Cisplatina je citostatik koji pripada skupini alkilirajućih sredstava te se primjenjuje u ovom istraživanju. To je kompleksni anorganski spoj građen od platine sintetskog podrijetla (Slika 1.)



Slika 1. Strukturna formula cisplatine

Cisplatina ulazi u stanice difuzijom i oštećuje heliks DNA. Budući je topljiva u vodi, antitumorska aktivnost ovoga spoja teškog metala temeljena je na otpuštanju dvaju iona Cl^- u vodenoj otopini. Tako aktivirani kompleks stupa u reakciju s nukleofilnim mjestima u DNA i RNA, tvoreći bifunkcionalne kovalentne veze pri čemu nastaju promjene na DNA formaciji i inhibicija DNA sinteze.

Cisplatina je jedan od najšire i najviše primjenjivanih citostatika, a rabi se isključivo u kombinaciji s drugim citostaticima, posebno s antraciklinima, bleomicinom, vinblastinom, fluorouracilom, ciklofosfamidom i etopozidom.

Cisplatin je vrlo djelotvoran u bolesnika s karcinomom testisa, placentnim koriokarcinomom, karcinomom ovarija, mikrocelularnim karcinomom bronha i karcinomom dojke.

Nuspojave koje može izazvati kod bolesnika su mijelotoksičnost, nefrotoksičnost (oštećenje bubrega), neurotoksičnost (oštećenje živaca), mučninu, povraćanje i gubitak kose (Turić i sur., 1996).

1.3. BIOTERAPIJA (IMUNOTERAPIJA)

Otkriće tumorsko specifičnih antigena i imunoreakcije domaćina tumora na njih bili su temelj u nizu pokušaja da se u liječenju bolesnika sa zloćudnim tumorima primijene imunološke metode – imunoterapija. *Imunoterapijom* se nastoji poticati i pojačati imunoreakcija kako bi se uništile tumorske stanice koje su izvan domašaja kirurškog liječenja, zračenja ili kemoterapije. Iako imunoterapija ima povijest dulju od jednog stoljeća, ustalila se kao prihvaćen način liječenja u malom broju tumorskih bolesti, a brojne imunoterapijske strategije ostale su u pokusnoj fazi (Turić i sur., 1996).

Sama imunosna reakcija protiv tumora vrlo je slaba i u stanju je uništiti najviše oko 10^5 do 10^8 zloćudnih stanica, što nije niti približno dovoljno u okolnostima ako se razvije tumor sa 10^9 do 10^{11} stanica. Postalo je jasno da imunosni sustav nije jedini koji sprječava rast i uništava zloćudne stanice, nego u tome sudjeluju i drugi obrambeni i kontrolnim međusobno povezani, sustavi organizma. Mnoge tvari i spojevi mogu pojačati tu specifičnu i nespecifičnu reakciju organizma protiv tumora. Uveden je i zajednički naziv za sve tvari s takvim djelovanjem: modifikatori biološke reakcije. To su tvari koje nisu izravno citotoksične za zloćudne stanice, ali posredno sprječavaju rast i uništavaju zloćudne tumore pojačavanjem i pospješivanjem specifičnih i nespecifičnih mehanizama obrane ili povećavanjem tolerancije organizma na klasične citostatike i zračenje. Prema današnjim saznanjima u modifikatore biološke reakcije u širem smislu možemo ubrojiti: 1. Bakterije ili njihove dijelove (BCG, bestatin, endotoksin, peptidoglikani), 2. Stanične polipeptidne produkte koji nisu protutijela, a sudjeluju u regulaciji imunosne reakcije - citokine (limfokini, interferoni i slični), 3. Citokine koji reguliraju hematopoezu – krvotvorne činitelje rasta (G-CSF, GM-CSF, eritropoetin, trombopoetin, IL-3, IL-6, IL-11) 4. Ostale citokine, činitelje rasta i regulatorne proteine (TGF, EGF, oktreoid, somatostatin), 5. Monoklonska protutijela, 6. Sintetičke produkte (Levamisol), 7. Spojeve koje pospješuju diferencijaciju stanica (retinoidi) (Šamija i sur., 2004).

Postoji nekoliko tipova imunoterapija:

- **Pasivna imunoterapija**

Pasivna se imunoterapija tumora osniva na prijenosu specifičnih protutumorskih protutijela, priređenih u drugom organizmu iste ili različite vrste. Mehanizam djelovanja antiseruma uglavnom je izravna citotoksičnost uperena protiv tumorskih stanica, ali se može protutijelima, kao specifičnim nosačima, uvesti selektivno u tumorske stanice neki toksin (npr. ricin), citostatik ili radioaktivni izotop (imunotoksini). Osnovni problem pri tom terapijskom postupku je taj što svi tumori nemaju iste antigene, a također su im neki antigeni zajednički s normalnim stanicama. Osim toga, protutijela oskudno prodiru u solidne tumore, a sljedeća je poteškoća u tome što tumorski antigeni u cirkulaciji mogu neutralizirati primijenjena protutijela. Tumorski se čvor sastoji od vrlo heterogene populacije zloćudnih stanica, pa bilo koja vrsta liječenja pogađa samo osjetljive stanice, dok preostala mala skupina stanica može opet obnoviti tumor.

- **Adoptivna imunoterapija**

Prijenos senzibiliziranih limfocitnih stanica (npr. koštane srži, slezene ili limfnoga čvora) može zaštititi životinju od tumorskog transplatata ili usporenje njegova rasta.

Limfociti bolesnika mogu se također izložiti senzibilizaciji u dodiru s antigenom vlastitog tumora *in vitro* i zatim se mogu vratiti u isti organizam. Pokušava se također potaknuti sazrijevanje i aktivnost stanica NK primjenom IL-2. Inkubacija stanica, izoliranih iz periferne krvi bolesnika, s IL-2 obavlja se izvan tijela, a zatim se se vlastite, limfokinima aktivirane stanice (LAK) vraćaju bolesniku. Sličan se postupak može provesti i s limfocitima koji infiltriraju tumor (TIL).

- **Specifična aktivna imunoterapija**

Aktivna imunizacija bolesnika mogla bi provesti antigenima vlastitog tumora, no rijetko se primjenjuje, a rezultati dobiveni kliničkom primjenom još su prilično kontroverzni. U novije se vrijeme tumorski antigen pokušava izolirati, definirati i klonirati, a zatim prirediti antigenični peptid koji se primjenjuje kao cjepivo.

- **Nespecifična aktivna imunoterapija**

Poznata su mnoga sredstva koja mogu izazvati nespecifičnu stimulaciju retikuloendotelnoga sustava kao npr. *Corynebacterium parvum*, glukan, levamisol i sl. Ti nespecifični imunomodulatori povećavaju broj i aktivnost imunokompetentnih stanica. Oni aktiviraju makrofage, koji pojačano izlučuju različite citokine, te izražavaju molekule MHC-II i kostimulacijske molekule B7. Tako oni bolje aktiviraju pomagačke limfocite T_H , čime povećavaju staničnu i humoralnu imunost.

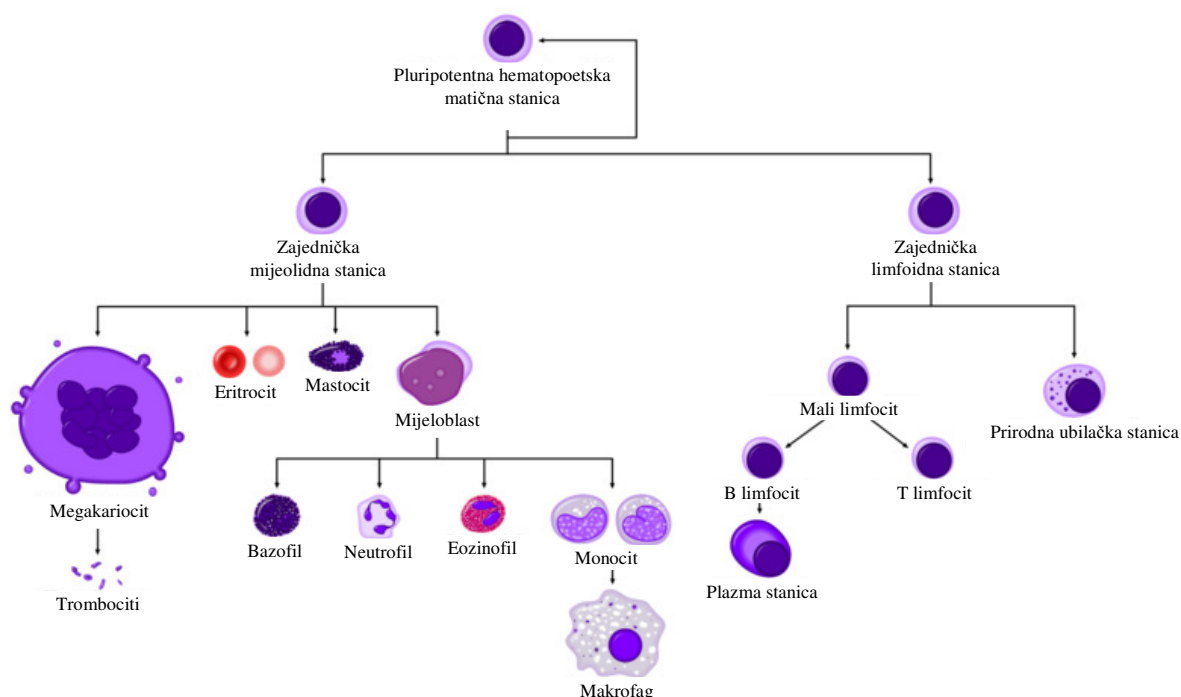
- **Restorativna imunoterapija**

Ovim se načinom liječenja pokušava obnoviti nedostatna imunosna funkcija, bez adoptivnoga prijenosa stanica. U tu svrhu upotrebljavaju se, primjerice antagonisti supresijskih utjecaja. Izolacija i kloniranje gena za različite citokine dovela je do mogućnosti njihove lake proizvodnje. U terapiji su iskušeni interferoni, leukini i dr. Osnovni je problem nepoznavanje vrlo složene i višestruke citokinske mreže, pa uz povoljna djelovanja mogu nastati i komplikacije opasne po život bolesnika (Andreis i sur., 2004).

1.4. HEMATOPOETSKI SUSTAV

Proces stvaranja krvnih stanica zove se hematopoeza. Hematopoetski sustav sastoji se od organa koji potpuno ili dijelom sudjeluju u stvaranju krvnih stanica, poput koštane srži, slezene, timusa, limfnih čvorova, ili samo od tkiva (nakupine imfocita u obliku limfnih čvorića). Zajedničko svojstvo elemenata tog sustava je da stvaraju krvne stanice i sudjeluju u mehanizmu hemostaze. Hematopoetski sustav čvrsto je povezan za opća zbivanja u organizmu. Promjene koje se odigravaju u organizmu očituju se gotovo redovito i u promjenama hematopoetskog sustava (npr. infekcije, zloćudni tumori) (Labar i sur. 1998).

Najprimitivnije ishodišne stanice za sve krvne stanice su pluripotentne matične hematopoetske stanice koje se diferenciraju u nezrele, prethodne stanice mijelopoetskog i limfopoetskog sustava iz kojih se procesima proliferacije i sazrijevanja nastaju funkcionalne zrele krvne stanice eritrociti, granulociti (eozinofili, neutrofil i bazofili), monociti, trombociti, kao i T i B limfociti.



Slika 2. Hematopoeza

1.5. HIPERTERMIJA

Riječ hipertermija potječe iz staroga grčkoga jezika (hiper = više, iznad i therme = toplina), a označuje stanje nekoga tijela koje ima veću temperaturu od normalne. Hipertermijom se može definirati svaka temperatura koja podiže temperaturu tijela iznad normalnih vrijednosti, a služi u svrhu izliječenja oboljelog organizma, a to su, uglavnom temperature veće od 40 °C.

Prvi pisani podaci o upotrebi hipertermije u liječenju malignih bolesti (tumora) mogu se naći u „prvom“ pisanom medicinskom tekstu – Edwin Smith Surgical Papyrus – koji je pronađen u Egiptu, a datira oko 3 000 godina prije Krista. U njemu se spominje upotreba vatre u liječenju raka dojke. Pradavnim Grcima, kao i drugim narodima toga doba upotreba hipertermije, koju su oni nazivali vatra, bila je među važnijim postupcima u liječenju raznih bolesti, kao i u liječenju karcinoma. Poznat je Hipokratov (400 god. pr. Kr) aforizam o uporabi hipertermije (vatre) u liječenju raznih bolesti, pa i tumora, koji na latinskom glasi:

„Quae medicamenta non sanat, ferum sanat.

Quae ferum non sanat, ignis sanat,

Quae vero ignis non sanat, insanabilia repotari oportet“.

Na hrvatskom taj aforizam glasi: „*Ono što lijekovi ne mogu izliječiti, može željezo (nož, kirurgija). Ono što željezo ne može izliječiti, može vatra (hipertermija). Ono što, pak, vatra ne može izliječiti, uistinu je neizlječivo (smatra se nezlječivim).*

1.5.1. Terapijski modaliteti hipertermije

Hipertermija se vrlo rijetko primjenjuje sama za sebe (per se). Najčešće se primjenjuje zajedno s radioterapijom (zračenje) i /ili kemoterapijom (citostaticima). Njezina primjena može biti lokalna, regionalna ili sistematska (data po cijelo tijelu). Lokalna primjena je najčešća, i to pri liječenju solidnih tumora te površinskih i duboko smještenih. Regionalna hipertermija se primjenjuje kad je potrebno zagrijati veću površinu tijela te kad su uz primarni tumorski rast nastale i regionalne metastaze. Sistemsom ili općom hipertermijom naziva se ona kod koje se zagrijava čitavo tijelo. Ona se najčešće primjenjuje pri liječenju leukemije i limfoma ili kada se nastale opće metastaze. Lokalna i regionalna hipertermija su redovito iznad 42 °C pa do 45 °C, dok sistemska hipertermija redovito ne prelazi 42 °C.

Lokalna i regionalna hipertermija najčešće se primjenjuju s pomoću ultrazvuka, frekvencije 300 kHz do 3 MHz, ili pomoću mikrovalova frekvencije 433, 915 i 2450 MHz, ili

pomoću radio-frekvencije na valnim dužinama od 8 do 30 MHz ili pomoću kupki u kojima je zagrijana tekućina, obično temperature od 42 °C do 45 °C. Opća hipertermija se provodi pomoću vrućih kupki u kojima može biti vrući zrak, vrući vosak ili vruća voda. Kod opće hipertermije treba obratiti pozornost na temperaturu vitalnih organa (mozak, jetra) koji su vrlo osjetljivi na temperaturu iznad 42 °C. Naime temperature veće od 42 °C mogu na tim organima izazvati ireverzibilna oštećenja.

Sa stajališta kliničke prakse primjena hipertemije u klinici ima dva nedostatka. Prvo, primjena hipertermije u liječenju tumora koji su smješteni duboko u organima i tkivima je neodgovarajuća zbog nedostatnog i neravnomjernog dovođenja topline u tumorsko tkivo. Drugi nedostatak hipertermije je nedovoljna termometrija. Naime, sva tehnička sredstva za mjerenje apsorbirane energije u dubokim tkivima i organima su neodgovarajuća i često teško primjenjiva, jer su invazivna. Ona su jedino primjenjiva za mjerenje apsorbirane energije na površinskim tumorima.

1.5.2. Biološki učinci hipertermije

Biološki djelotvornom i svrsishodnom hipertermijom smatraju se temperature veće od 41 °C, pa do 45 °C. Temperature veće od 45 °C uzrokuju ireverzibilne procese u normalnim tkivima i stoga se vrlo rijetko primjenjuju u *in vivo* uvjetima. Biološki učinak hipertermije ovisi o jačini temperature te o vremenu izlaganja stanica i tkiva toj temperaturi. Općenito je poznato da se za svaki stupanj (1 °C) porasta temperature vrijeme trajanja terapije može skratiti za polovicu kako bi se postigao isti terapijski (citotoksični) učinak.

Pod utjecajem temperatura većih od 42 °C nastaju bitne promjene u staničnoj membrani, citoskeletu, citosolu i jezgri.

MEMBRANA. Stanična membrana je dio stanice koji je izravno u dodiru s unutarstaničnom i vanstaničnom tekućinom. Stanična membrana ima najveće značenje u nastanku stanične smrti uzrokovane hipertermijom jer svi hipertermijski učinci kreću od stanične membrane. Membranski fosfolipidi i proteini, pod utjecajem hipertermije, doživljavaju strukturalne i funkcionalne promjene, zbog čega nastaju promjene u membranskoj viskoznosti i fluidnosti.

CITOSKELETON. Citoskeleton je stanična struktura koja omogućuje vezu između stanične membrane i jezgre. Hipertermija uzrokuje znatne promjene svih komponenata citoskeletona (mikrofilamenata, mikrotubularnih i intermedijarnih filamenata). Stupanj

oštećenja ovisi o jačini temperature i o dužini liječenja, te o tipu stanica. Mikrofilamenti su fine strukturne niti koje su građene od aktina, aktinina, miozina i tropomiozina, a imaju bitnu zadaću u održanju citoplazmatske strukture. Mikrotubularni filamenti uz centromere sudjeluju u tvorbi diobenog vretena. Pod utjecajem visokih temperatura mikrotubularni filamenti se raspadaju, zbog čega nema mitoze, pa stanice umiru u fazi mitoze. Intermedijarni filamenti, koji vežu mikrotubule za staničnu membranu, pod djelovanjem visoke temperature gube strukturu i raspadaju se.

CITOSOL. Hipertermija uzrokuje i strukturne i funkcionalne promjene citosolnih elemenata (mitohondrija, endoplazmatskog retikuluma i Golgijeva aparata). Lizosomi i polisomi bivaju znatno oštećeni, a sinteza proteina zaustavljena. Mitohondriji postaju zbog visoke temperature natečeni, potom ispucani i nefunkcionalni. Lizosomi koji su rezervoar hidrolitičkih enzima pod utjecajem hipertermije bivaju također oštećeni tj. dolazi do oštećenja lizosomske membrane što dovodi do porasta lizosomskih enzima.

- ***Jezgra.***

Stanična jezgra sadrži najveći dio genetskih informacija smještenih u DNA. Njezina funkcija je čuvanje, umnažanje i ekspresija tih informacija. Pod utjecajem visoke temperature na jezgri se događaju i strukturne i funkcionalne promjene. *Jezgrica*, na kojoj teče proces prepisivanja i odmatanja rRNA, djelovanjem hipertermije biva oštećena. Oštećenja su zapažena i na nuklearnom matriksu. Sav enzimatski sastav, a posebice DNA i RNA polimeraze, bivaju pod visokom temperaturom jako zakočene. Zbog svih tih oštećenja nema sinteze DNA ni njezina popravka kao ni sinteze RNA.

- ***Proteini stresa (HSP).***

Visoke temperature predstavljaju veliki šok za stanicu koja se pokušava zaštititi stvaranjem stresa proteina. Prepostavlja se da HSP ima dvojaku zadaću. Prvo, da zaštite stanicu od jakog termičkog oštećenja, naročito oštećenja nastalih na DNA i RNA. Drugo, da omoguće stanici popravak DNA oštećenja.

1.5.3. Faktori koji utječu na hipertermijski učinak

Maligne stanice su osjetljivije na temperaturu od normalnih stanica, i to zbog njihova različita mikrokoliša, koji ih čini osjetljivima na hipertermiju. Naime, u malignom tkivu

često je prisutna acidoza, hipoksija, slaba opskrba prehrambenim tvarima te slaba mikrocirkulacija, što čini tumorske stanice termosenzitivnijima od normalnih stanica.

Krvne žile u normalnom tkivu (koža, mišić) mogu, djelovanjem hipertermije, povećati protok krvi dočim krvne žile tumora nemaju tu sposobnost. Krvne žile u tumoru, zbog nepotpune anatomske građe, pod djelovanjem hipertermije brzo kolabiraju (popucaju) te kroz tumor nema protoka krvi. Kako nema protoka krvi dolazi do nakupljanja toplinske energije, koja izravno ubija tumorske stanice (Turić i sur., 1996).

1.6. PROPOLIS

1.6.1. Što je propolis?

Propolis je smola koju pčele radilice skupljaju s rastućih dijelova biljaka, npr. s pupoljaka ili oštećenih dijelova biljaka. U sakupljanju propolisa sudjeluje relativno mali broj pčela koje su izvan košnice zadužene samo za tu aktivnost. One čeljustima skidaju smolu s biljaka i miješaju je sa sekretom svojih čeljustnih žlijezda, stavljaju u košarice nožica i odnose u košnicu. Miješajući ga s voskom njime oblažu i ravnaju voštane saće, zidove i strop košnice, zatvaraju pukotine i rupe, pričvršćuju okvire i smanjuju otvor košnice u jesen. Njime oblažu (mumificiraju) sitne životinje i insekte koji dospiju u košnicu da spriječe raspadanje. Svojim dezinfekcijskim i antimikrobnim djelovanjem zaštićuju pčelinju zajednicu od štetnih mikroorganizama.

1.6.2. Fizikalna i kemijska svojstva propolisa

Propolis je smolasta tvar žutozelene do smeđe ili tamnocrvene boje. Na temperaturi iznad 30 °C je mekana ljepljiva masa, a ispod 15 °C krta i čvrsta. Ima karakterističan miris na smolu, a okus je gorak. Niti jedno otapalo ga u potpunosti ne otapa. Alkohol ga na sobnoj temperaturi može otopiti 60% do 70%, a voda između 7% i 11%.

Kemijski sastav propolisa je varijabilan, jer ovisi o biljkama koje pčele posjećuju kada ga skupljaju. Do sada je utvrđeno da pčele skidaju propolis s 67 različitih vrsta biljaka. Zato njegov sastav nije konstantan i neki od značajnijih spojeva mogu varirati od 10 % do 70%.

Načelno, propolis sadrži do 30 % pčelinjeg voska, oko 20% mehaničkih primjesa, 40-60% smola i balzama, 5-10% eteričnih ulja, 4-15% tanina, 5% peluda i oko 5% drugih organskih spojeva i minerala. Propolis je bogat aminokiselinama, te ima visoki sadržaj vitamina, uključujući bioflavonoide (koji imaju poznato antioksidantno djelovanje). Tako od

vitamina sadrži vitamine B1, B2, B6, C, E, nikotinsku kiselinu i pantotensku kiselinu, te slijedeće minerale: natrij, kalij, magnezij, kalcij, barij, bor (u tragovima), stroncij, cink, kadmij, silicij, olovo, selen (u tragovima), nikal, krom, mangan, titan, srebro, bakar, kobalt, molibden, vanadij. Do sada je izolirano više od 200 sastojaka u propolisu i nije još do kraja istražen.

Veći dio sastojaka je biljnog porijekla, kao što su flavonoidi, organske kiseline, terpeni, alkoholi i esteri koji uglavnom potječu od smole s pupoljka. Poznato je da većina flavonoida i organskih molekula sadržanih u smoli zaustavljaju rast biljaka i imaju antimikrobni učinak.

Najvažniji farmakološki aktivne komponente u propolisu su flavonoidi (flavoni, flavonoli i flavononi), različiti fenoli i aromatski spojevi. Vjeruje se da **flavonoidi** predstavljaju osnovu biološke aktivnosti propolisa. Oni čine preko 25% svih komponenti koji se u propolisu nalaze u slobodnom stanju, a biljnog su porijekla. Flavonoidi imaju dvostruku ulogu: prva je zaštitnička, a druga je da potiče temeljne metaboličke procese. Najveća koncentracija flavonoida je na pupovima biljaka, gdje ih svojom prisutnošću štite od nametnika i niskih temperatura. Od flavonoida u propolisu nalazimo: kamferol, naringenin, kofeinsku kiselinu, krizin, pinocenbrin, apigenin i galangin. Flavonoidi kod biljaka vezani su za šećer, što znači da se oni pod utjecanjem pčelinjih enzima odvajaju od šećera. Do sada je u propolisu nađeno 38 različitih vrsta flavonoida.

1.6.3. Biološka svojstva propolisa

Propolis ima raznolika i višestruka biološka svojstva. Brojna istraživanja pokazala su da djeluje protiv bakterija, gljivica, virusa, parazita i upala te da ima anestetički, antioksidacijski i antitumorski učinak, sprječava rast biljaka i klijanje sjemena, potiče regeneraciju tkiva i jača imunološki sustav.

Antibakterijska svojstva. Antibakterijsko djelovanje propolisa jače je izraženo na gram-pozitivne (streptokok, stafilokok), nego na gram-negativne bakterije (*Salmonella*, *Escherichia coli*). Mehanizam djelovanja je složen i različit od načina djelovanja antibiotika. Propolis zaustavlja razmnožavanje bakterija tako da oštećuje njenu citoplazmu, citoplazmatsku i staničnu membranu, uzrokuje djelomičnu bakteriolizu i inhibira proteinsku sintezu. Kada se uzima zajedno s nekim antibioticima (penicilin, streptomycin, tetraciklin i dr.), pojačava njihovo djelovanje. Zanimljivo je da u slučaju kada antibiotici sami ne djeluju

na neke bakterije (npr. *Staphylococcus aureus*), u kombinaciji s propolisom pokazuju antibakterijski učinak.

Antigljivična svojstva. Propolis ima protugljivično djelovanje na različite gljivice uglavnom uzročnike bolesti kože i kose (*Trychophyton*, *Candida*, *Trichsporon*).

Antiparazitna svojstva. Propolis zaustavlja rast jednostaničnog parazita *Trichomonas vaginalis*, uzročnika upale spolnih organa kod žena i mokraćovoda kod muškaraca.

Antivirusna svojstva. Propolis djeluje protiv različitih virusa *Herpes simplex*, *Herpes genitalis*, *Herpes zoster*, gripe i velikih boginja što se pripisuje njegovim antioksidacijskim svojstvima.

Antiupalna svojstva. Ispitivanja su pokazala da propolis ima snažno protuupalno djelovanje kod akutnih i kroničnih upala. Osnova ovog učinka nije samo u djelovanju na upale izazvane infekcijama, već je aktivan i protiv aseptičnih upala koje nisu izazvane infekcijskim agensom (opekline od sunca, vatre, zračenja i kemijskih tvari).

Antioksidacijska svojstva.

Slobodni radikali. Propolis svojim antioksidacijskim svojstvom neutralizira nakupljanje vrlo štetnih tvari u organizmu tzv. slobodnih radikal, koji nastaju kao normalna posljedica metabolizma.

Mrena. Ispitivanje na miševima pokazuju da propolis sprječava nastajanje mreine i poboljšava antioksidacijsku obranu krvi i leće, te štiti rožnicu od neovaskularizacije kod kemijske povrede.

Moždani udar. Ustanovljeno je da propolis zajedno sa peludom kod pacijenta s moždanim udarom podiže antioksidacijsku obranu i opskrbu mozga krvlju što omogućava brži i potpuni oporavak poremećenih i izgubljenih funkcija.

Bubrezi. Antioksidacijske tvari iz propolisa štite bubrege miševa od akutnog oštećenja koje izazivaju neki citostatici (cisplatin) za vrijeme kemoterapije.

Jetra. Ispitivanja na miševima su pokazala da propolis štiti jetru od kemijskih otrova i alkohola što se pripisuje njegovoj sposobnosti hvatanja slobodnih radikala.

Srce. Na miševima je dokazano da propolis štiti srce od toksičnih tvari koji slobodnim radikalima oštećuju srčano tkivo.

Jačanje imuniteta. Rezultati ukazuju da propolis pojačava imunološke mehanizme za proizvodnju specifičnih i nespecifičnih obrambenih tvari (IL-1, limfocitni interferon, aktivacija makrofaga) kojima se suprosvavlja uzročniku bolesti i spriječava njeno napredovanje, neovisno o urođenim i stečenim imunološkim kapacitetima. Stručno se takav učinak definira kao **imunomodulacijsko ili imunoregulacijsko djelovanje**, a popularno kao **jačanje imunološkog sustava**.

Antitumorsko djelovanje. Ispitivanja u laboratorijskim uvjetima i na životinjama su pokazala da propolis kod tumorskih bolesti potiče imunološki sustav na pojačanu aktivnost NK-stanica i drugih specifičnih i nespecifičnih obrambenih tvari, a istovremeno pokreće mehanizam smrti tumorskih stanica. Njegova antimetastatska svojstva također su vezana za imunološku aktivnost.

Karcinom trbušne šupljine. Pokusi na miševima su pokazali da propolis u kombinaciji sa citostaticima značajno smanjuje napredovanje karcinoma trbušne šupljine, a oporavak bijelih i crvenih krvnih stanica je brži, nego kada se koriste sami citostatici.

Istraživanja sa propolisom proveli su i dr. sc. Oršolić i suradnici koji su dokazali utjecaj polifenolnih komponenta i samog propolisa na rast i metastatski potencijal karcinoma. Metastaze su unešene u pluća miša intravenoznom injekcijom tumorskih stanica. Primjećen je značajno smanjen broj tumorskih čvorića u plućima miševa koji su prije inokulacije tumorskih stanica peroralno dobivali propolis ili njegove polifenolne komponente. Autori pretpostavljaju da propolis ima antitumorsko djelovanje zbog imunomodulacijskih svojstava, citotoksičnosti prema stanicama tumora i sposobnosti indukcije apoptoze i nekroze stanica.

Karcinom pluća. Istraživanja na miševima su utvrdila da propolis smanjuje rizik od nastajanja tumora i metastaziranja na plućima, a kombinacija sa citostatikom je još učinkovitija.

Karcinom debelog crijeva. Istraživanja dokazuju da propolis spriječava oštećenja debelog crijeva koja mogu biti uzrokom razvoja karcinoma. Kod već nastalog karcinoma, usporava njegov rast i smanjuje rizik od njegovog metastaziranja na jetri.

Karcinom dojke. Brojni pokusi pokazuju da propolis usporava rast karcinoma dojke tako da sprječava razmnožavanje njegovih stanica ili aktivira mehanizam apoptoze.

Leukemija. U laboratorijskim uvjetima na modelu ljudskih leukemijskih stanica (HL-60) utvrđeno je da jedna komponenta iz propolisa ubija stanice tumora.

Djelovanje protiv zamora. Na miševima je dokazano da propolis sprječava zamor i povećava tjelesnu izdržljivost.

Resorpcijska svojstva. Poboljšava digestivnu resorpciju željeza, kalcija, fosfora i magnezija. Ispitivanja na miševima su pokazala da zajedno sa peludom povećava prijelaz željeza iz probavnog sustava u krv i obnovu hemoglobina kod anemije uzrokovane nedostatkom željeza.

Toksičnost. Svi se slažu da propolis nije toksičan. Eksperimenti provedeni na miševima pokazuju da se toksične doze teško dostižu ili se ne mogu utvrditi.

Alergijske reakcija. Alergija se manifestira crvenilom na mjestu kontakta (Radić, 2004).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

S obzirom na raznolika i višestruka biološka svojstva propolisa željeli smo istražiti zaštitni učinak propolisa od toksičnosti uzrokovane kemoterapeutikom cisplatinom pri povišenoj temperaturi (hipertermiji).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI KORIŠTENI U ISTRAŽIVANJU

3.1.1. Pokusne životinje

U istraživanju su se koristili visokosrodni miševi istog spola, soja Swiss albino, dobi oko 2 mjeseca, mase 20 – 25 g, iz uzgoja Zavoda za Animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Miševi su se držali u kavezima s najviše 5 životinja uz stalnu dostupnost standardne hrane za glodavce (Standard Diet 4RF 21 GLP certificate, Mucedola, Italija) i vode.

Istraživanje se provelo u skladu s važećim etičkim načelima Republike Hrvatske (Zakon o zaštiti životinja, Narodne novine broj 135/06, Pravilnik o uvjetima držanja pokusnih životinja, posebnim uvjetima za nastambe i vrstama pokusa, Narodne novine broj 176/04) i prema Vodiču za držanje i korištenje laboratorijskih životinja (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, DHHS Publ. (NIH) 86-23, 1985).

3.1.2. Erlichov ascitesni tumor

Erlichov ascitesni tumor (EAT) je heterogeni, slabo diferencirani, brzorastući zloćudni tumor koji sadrži populacije stanica različite osjetljivosti, a izvorno se javlja kao spontani karcinom mliječne žlijezde u miša. Stanice Ehrlichovog ascites tumora (EAT) održavale su se intraperitonealno (*i.p.*) u Swiss albino miševima, serijskim presađivanjem stanica svakih 7 ili 9 dana u obliku ascitesa. Nakon ispiranja trbušne šupljine s 5 ml fiziološke otopine i lagane masaže trbušne stijenke, napravi se rez i otvori peritonealna šupljina miša. Pasteurovom pipetom uzme se peritonealnu tekućinu s tumorskim stanicama i razrijedi s fiziološkom otopinom (0.9% otopina natrij klorida, Pliva) do ciljane koncentracije 2×10^6 EAT stanica/0.5 ml. Unos EAT stanica u peritonealnu šupljinu miša predstavlja 0. dan pokusa.

3.1.3. Vodena otopina propolisa

U istraživanju se koristio propolis porijeklom iz stacionarnog pčelinjaka koji je smješten u okolici Zagreba. Od sirovog propolisa pripremili smo pripravak u obliku vodene otopine.

Vodena otopina propolisa (VOP) pripremila se usitnjavanjem i otapanjem propolisa u 96% etanolu tijekom 3 dana pri temperaturi 20 – 25 °C, uz povremeno miješanje. Nakon

otapanja, alkoholna otopina propolisa se odvojila od taloga filtriranjem kroz filter papir, a potom se uparila do suhog na vakuumskom uparivaču (Buchi-rota vapor <R>, Switzerland). Na svakih 10 g ovako pripremljenog propolisa, dodalo se 150 ml 8% otopine lizina (Sigma Chemie, Germany), a potom miješalo tijekom 30 minuta na magnetskoj miješalici pri temperaturi 50 °C. Nakon filtriranja, otopina se upari do suhog (Nikolovet i sur., 1987). Suhi prah se čuvao u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C. Neposredno prije uporabe, otapanjem u vodi za injekcije pripremila se doza 50 mg kg⁻¹.

3.1.4. Citostatik cisplatina

U istraživanju se koristio citostatik cisplatina (Cisplatin, Pliva). Za potrebe pokusa, neposredno prije uporabe razrijedio se u vodi za injekcije u dozi od 5 i 10 mg kg⁻¹.

3.2. METODE KORIŠTENE U ISTRAŽIVANJU

3.2.1. Postupak sa životinjama

Miševe smo slučajnim odabirom raspodijelili u pokusne skupine od 13 do 15 životinja. Prilikom preventivne obrade miševa, 7. i 3. dana prije *i.p.* unosa 2×10⁶ EAT stanica, proveli smo *i.p.* primjenu pripravaka propolisa u dozi 50 mg kg⁻¹. Kemoterapija (37 °C) i hipertermička kemoterapija (43 °C) s cisplatinom u dozi od 5 i 10 mg kg⁻¹ provela se treći dan nakon unosa tumorskih stanica u peritonealnu šupljinu miševa.

Neposredno prije uzimanja uzoraka za analizu, životinje su se uspavljivale u eksikatoru s dietil eterom i prema potrebi žrtvovala cervikalnom dislokacijom.

Uzorci krvi za analizu hematoloških parametara pri preventivnoj obradi miševa uzimali su se 3., 10. i 17. dana od unosa EAT stanica u peritonealnu šupljinu miša.

3.2.2. Intraperitonejska hipertermija

Intraperitonejsku hipertermiju smo postigli *i.p.* unosom fiziološke otopine u količini 2×2 ml, prethodno zagrijane u vodenoj kupelji na 43 °C, a proveli smo je neposredno prije primjene citostatika.

3.2.3. Analiza hematoloških parametara

Analizom hematoloških parametara krvi dobili smo uvid u promjene sastava krvi, a također smo dobili uvid u mogući hemostimulativni i zaštitni učinak propolisa.

Krv smo uzimali Pasteurovom pipetom iz pazušno spleta krvnih žila miševa. Za

potrebe hematoloških analiza krv smo stavili u epruvetu s K₂EDTA kao antikoagulansom (Microtainer, BD). Od hematoloških parametara odredili smo ukupan broj eritrocita, leukocita, udio pojedinih leukocita u perifernoj krvi te koncentraciju hemoglobina. Hematološke parametre u krvi analizirali smo brojačem krvnih stanica Cell.Dyn (Abbott, SAD).

4. REZULTATI

Učinak hipertermičke kemoimunoterapije na imunosne odrednice u miša nositelja Erlichovog ascitesnog tumora istražili smo praćenjem hematoloških i imunosnih odrednica miša 3., 10. i 17. dana od unosa EAT stanica u peritonealnu šupljinu miša. Miševe smo preventivno obradili *i.p.* pripravkom vodene otopine propolisa (VOP) u dozi 50 mg kg^{-1} 7. i 3. dana prije *i.p.* unosa 2×10^6 EAT stanica. Kemoterapiju (37°C) i hipertermičku kemoterapiju (43°C) s cisplatinom u dozi od 5 i 10 mg kg^{-1} primjenili smo treći dan nakon unosa tumorskih stanica u peritonealnu šupljinu miševa.

Analizirali smo sljedeće hematološke i imunološke odrednice: ukupni broj leukocita, polimorfonuklearne leukocite, mononuklearne leukocite, ukupni broj eritrocita, koncentraciju hemoglobina, hematokrit, MCV, MCH, MCHC i ukupni broj trombocita. Rezultate smo prikazali u Tablicama 1- 6.

Tablica 1. Hematološke i imunosne odrednice miševa s Erlichovim ascitesnim tumorom nakon preventivne intraperitonejske imunoterapije propolisom te kemoterapije cisplatinom

Skupina Preventivna obrada 37°C ^a		Kontrola	VOP	Cispl. 5 mg kg ⁻¹	Cispl. 5 mg kg ⁻¹ + VOP	Cispl. 10 mg kg ⁻¹	Cispl. 10 mg kg ⁻¹ + VOP
Hematološki parametri 3. dan nakon <i>i.p.</i> unosa EAT stanica (2×10 ⁶) (S.V. ± S.D.)	Leukociti (×10 ⁹ L ⁻¹)	7.75 ± 1.60	5.90 ± 1.91	7.84 ± 2.99	6.62 ± 1.37	6.58 ± 2.05	4.87 ± 0.16*
	Polimorfo-nuklearni leukociti (%)	44.46 ± 11.21	47.14 ± 8.28	57.73 ± 7.09	56.73 ± 3.54	37.17 ± 5.60	49.67 ± 2.91 [•]
	Mono-nuklearni leukociti (%)	55.54 ± 11.26	52.87 ± 8.29	42.27 ± 7.07	43.26 ± 3.54	62.83 ± 5.64	50.33 ± 2.87 [•]
	Eritrociti (×10 ¹² L ⁻¹)	8.67 ± 0.99	8.48 ± 0.56	7.38 ± 1.65	7.67 ± 0.90	9.53 ± 1.94	9.79 ± 0.77
	Hemoglobin (g L ⁻¹)	126.40 ± 18.16	122.15 ± 7.50	108.40 ± 23.12	113.60 ± 11.30	143.40 ± 26.70	145.45 ± 7.22
	Hematokrit (L L ⁻¹)	0.42 ± 0.05	0.41 ± 0.03	0.36 ± 0.08	0.38 ± 0.04	0.47 ± 0.09	0.48 ± 0.02
	MCV (f L)	97.70 ± 2.07	96.25 ± 0.70	97.90 ± 3.70	98.50 ± 0.77	98.90 ± 1.47	97.90 ± 2.73
	MCH (p g)	29.10 ± 1.09	28.85 ± 0.75	29.45 ± 1.28	29.65 ± 0.68	30.25 ± 1.18	29.85 ± 1.39
	MCHC (g L ⁻¹)	596.00 ± 11.43	600.00 ± 19.80	600.50 ± 4.43	603.00 ± 14.09	610.50 ± 18.79	608.50 ± 16.20
	Trombociti (×10 ¹² L ⁻¹)	1307.50 ± 170.41	798.67 ± 74.33*	1233.33 ± 46.23	896.50 ± 157.13* [♦]	1113.33 ± 62.01	1517.33 ± 174.31 [•]

^a Životinje su preventivno obrađene s VOP-a 7. i 3. dana (50 mg kg⁻¹) prije *i.p.* unosa EAT stanica (2×10⁶). Cisplatina je primijenjena *i.p.* (5 i 10 mg kg⁻¹) 3. dana nakon *i.p.* unosa EAT stanica.

* Statistički značajno (p<0.05) u odnosu na kontrolnu skupinu (Student test).

[♦] Statistički značajno (p<0.05) u odnosu na skupinu Cisplatin 5 mg kg⁻¹ (Student test).

[•] Statistički značajno (p<0.05) u odnosu na skupinu Cisplatin 10 mg kg⁻¹ (Student test).

Skupina sadržava 4 životinje.

Vrijednosti hematoloških i imunoloških odrednica svih skupina 3. dan nakon *i.p.* unosa EAT stanica (2×10⁶), te nakon preventivne intraperitonejske imunoterapije propolisom te kemoterapije cisplatinom, u odnosu na kontrolu pokazane su u Tablici 1. Broj leukocita 3. dan nakon *i.p.* unosa EAT stanica (2×10⁶) u skupine Cisplatina 10 mg kg⁻¹ + VOP se statistički značajno smanjio (p<0,05; 4,87 ± 0,16) u odnosu na kontrolnu skupinu (7,75 ± 1,60). Postotak polimorfonuklearnih leukocita skupine Cisplatina 10 mg kg⁻¹ + VOP se statistički značajno povećao (p<0,05) u odnosu na vrijednosti polimorfonuklearnih leukocita skupine Cisplatin 10 mg kg⁻¹. Rezultati ukazuju da je postotak mononuklearnih leukocita

skupine Cisplatina 10 mg kg⁻¹ +VOP statistički značajno (p<0,05) smanjen u odnosu na vrijednosti mononuklearnih leukocita same Cisplatine 10 mg kg⁻¹. Vrijednost trombocita životinja obrađenih VOP je statistički značajno smanjena (p<0,05; 798,67 ± 74,33) u odnosu na kontrolnu skupinu životinja (1307,50 ± 170,41). Broj trombocita životinja obrađenih s Cisplatinom 5 mg kg⁻¹ + VOP je statistički značajno (p<0,5) manji u odnosu na kontrolnu skupinu i skupinu obrađenu s Cisplatinom 5 mg kg⁻¹. Broj trombocita skupine životinja obrađene Cisplatinom 10 mg kg⁻¹ + VOP je statistički značajno (p<0,5) veći u odnosu na skupinu obrađenu samo s Cisplatinom 10 mg kg⁻¹.

Tablica 2. Hematološke i imunosne odrednice miševa s Erlichovim ascitesnim tumorom nakon preventivne intraperitonejske imunoterapije propolisom te kemoterapije cisplatinom s istovremenom hipertermijom

Skupina Preventivna obrada 43°C ^a		Kontrola	Cispl. 5 mg kg ⁻¹	Cispl. 5 mg kg ⁻¹ + VOP	Cispl. 10 mg kg ⁻¹	Cispl. 10 mg kg ⁻¹ + VOP
Hematološki parametri 3. dan nakon <i>i.p.</i> unosa EAT stanica (2×10 ⁶) (S.V. ± S.D.)	Leukociti (×10 ⁹ L ⁻¹)	7.75 ± 1.60	8.13 ± 1.03	7.03 ± 1.36	7.34 ± 1.24	5.83 ± 1.32
	Polimorfo-nuklearni leukociti (%)	44.46 ± 11.21	49.60 ± 11.56	34.66 ± 5.28	45.51 ± 9.37	37.39 ± 1.10
	Mono-nuklearni leukociti (%)	55.54 ± 11.26	50.38 ± 11.55	65.32 ± 5.33	54.46 ± 9.40	62.64 ± 1.10
	Eritrociti (×10 ¹² L ⁻¹)	8.67 ± 0.99	8.05 ± 1.33	8.96 ± 1.16	9.33 ± 0.37	8.95 ± 0.46
	Hemoglobin (g L ⁻¹)	126.40 ± 18.16	113.60 ± 17.38	129.40 ± 16.80	130.75 ± 4.42	134.27 ± 8.40
	Hematokrit (L L ⁻¹)	0.42 ± 0.05	0.39 ± 0.07	0.44 ± 0.06	0.45 ± 0.01	0.44 ± 0.02
	MCV (f L)	97.70 ± 2.07	95.95 ± 1.17	98.10 ± 2.03	96.05 ± 1.59	99.27 ± 0.61
	MCH (p g)	29.10 ± 1.09	28.30 ± 0.93	28.90 ± 0.95	28.05 ± 0.19	30.00 ± 0.35 [•]
	MCHC (g L ⁻¹)	596.00 ± 11.43	589.00 ± 22.72	589.00 ± 15.45	584.50 ± 7.00	604.67 ± 11.37 [•]
	Trombociti (×10 ¹² L ⁻¹)	1307.50 ± 170.41	1578.00 ± 35.38	965.00 ± 179.62*	1028.00 ± 218.05	952.00 ± 99.02* [♦]

^a Životinje su preventivno obrađene s VOP-a 7. i 3. dana (50 mg kg⁻¹) prije *i.p.* unosa EAT stanica (2×10⁶). Cisplatina je primijenjena *i.p.* (5 i 10 mg kg⁻¹) uz istovremenu intraperitonejsku hipertermiju 3. dana nakon *i.p.* unosa EAT stanica.

* Statistički značajno (p<0.05) u odnosu na kontrolnu skupinu (Student test).

♦ Statistički značajno (p<0.05) u odnosu na skupinu Cisplatin 5 mg kg⁻¹ (Student test).

• Statistički značajno (p<0.05) u odnosu na skupinu Cisplatin 10 mg kg⁻¹ (Student test).

Skupina sadržava 4 životinje.

Vrijednosti hematoloških i imunoloških odrednica svih skupina 3. dan nakon *i.p.* unosa EAT stanica (2×10^6), te nakon preventivne intraperitonejske imunoterapije propolisom te kemoterapije cisplatinom s istovremenom hipertermijom (43 °C) prikazane su u Tablici 2. MCH i MCHC vrijednosti u združenoj obradi životinja s Cisplatinom 10 mg kg^{-1} i VOP su statistički značajno ($p < 0,05$) veće u odnosu na MCH i MCHC vrijednost životinja obrađenih s Cisplatinom u dozi od 10 mg kg^{-1} . Vrijednost trombocita ($965,00 \pm 179,62$) životinja obrađenih s Cisplatinom u dozi od 5 mg kg^{-1} je značajno ($p < 0,05$) manja u odnosu na vrijednost trombocita kontrolne skupine. Vrijednost trombocita u skupini obrađenoj s Cisplatinom 10 mg kg^{-1} i VOP-om je značajno manja ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu i u odnosu na skupinu Cisplatin 5 mg kg^{-1} .

Tablica 3. Hematološke i imunosne odrednice miševa s Erlichovim ascitesnim tumorom nakon preventivne intraperitonejske imunoterapije propolisom te kemoterapije cisplatinom

Skupina Preventivna obrada 37°C ^a		Kontrola	VOP	Cispl. 5 mg kg ⁻¹	Cispl. 5 mg kg ⁻¹ + VOP	Cispl. 10 mg kg ⁻¹	Cispl. 10 mg kg ⁻¹ + VOP
Hematološki parametri 10. dan nakon <i>i.p.</i> unosa EAT stanica (2×10 ⁶) (S.V. ± S.D.)	Leukociti (×10 ⁹ L ⁻¹)	12.25 ± 2.59	17.96 ± 2.97*	16.75 ± 7.64	16.51 ± 7.80	10.91 ± 2.06	9.93 ± 2.51
	Polimorfo-nuklearni leukociti (%)	62.34 ± 7.97	63.10 ± 10.54	59.44 ± 18.27	59.21 ± 28.40	56.73 ± 27.68	43.33 ± 13.60
	Mono-nuklearni leukociti (%)	37.69 ± 7.99	36.91 ± 10.57	40.58 ± 18.26	40.82 ± 28.40	43.23 ± 27.68	56.65 ± 13.62
	Eritrociti (×10 ¹² L ⁻¹)	9.50 ± 0.24	7.51 ± 1.08*	8.47 ± 1.00	8.67 ± 0.21*	9.22 ± 1.21	8.52 ± 0.20*
	Hemoglobin (g L ⁻¹)	139.45 ± 3.21	113.70 ± 13.26*	126.55 ± 10.43	126.95 ± 4.47*	136.75 ± 17.81	123.30 ± 4.07*
	Hematokrit (L L ⁻¹)	0.46 ± 0.01	0.38 ± 0.04*	0.41 ± 0.04	0.42 ± 0.01*	0.44 ± 0.05	0.41 ± 0.01*
	MCV (f L)	96.95 ± 0.75	100.35 ± 7.24	97.85 ± 1.98	97.70 ± 1.51	95.10 ± 2.09	95.60 ± 1.70
	MCH (p g)	29.40 ± 0.28	30.45 ± 2.77	29.95 ± 1.17	29.30 ± 0.53	29.70 ± 1.36	29.00 ± 0.46
	MCHC (g L ⁻¹)	606.50 ± 8.23	607.00 ± 10.39	612.50 ± 19.82	600.00 ± 5.89	624.00 ± 14.51	606.00 ± 5.89
	Trombociti (×10 ¹² L ⁻¹)	2077.50 ± 196.15	2004.00 ± 407.17	1994.00 ± 266.22	1815.00 ± 213.19	944.00 ± 199.71*	1094.50 ± 218.23*

^a Životinje su preventivno obrađene s VOP-a 7. i 3. dana (50 mg kg⁻¹) prije *i.p.* unosa EAT stanica (2×10⁶). Cisplatina je primijenjena *i.p.* (5 i 10 mg kg⁻¹) 3. dana nakon *i.p.* unosa EAT stanica.

* Statistički značajno (p<0.05) u odnosu na kontrolnu skupinu (Student test).

Skupina sadržava 4 životinje.

U skupini obrađenoj VOP-a 10. dan nakon *i.p.* unosa EAT stanica (2×10⁶), broj leukocita se značajno (p<0,05) povećao u odnosu na broj leukocita kontrolnu skupine (Tablica 3).

Ostali hematološke odrednice, kao broj eritrocita, koncentracija hemoglobina i hematokrita u skupini životinja obrađenih VOP-a su statistički značajno (p<0,05) smanjene u odnosu na iste vrijednosti kontrolne skupine.

Združena obrada miševa s Cisplatinom 5 i/ili 10 mg kg⁻¹ i VOP-a imala je statistički značajno manji broj eritrocita, hemoglobina i hematokrita (p<0,05) u usporedbi s kontrolnom skupinom.

Također smo zabilježili statistički značajno ($p < 0,05$) manji broj trombocita u skupini obrađenoj Cisplatinom u dozi od 10 mg kg^{-1} u odnosu na vrijednost trombocita kontrolne skupine.

Broj trombocita skupine miševa obrađene s Cisplatinom 10 mg kg^{-1} i VOP-a statistički značajno ($p < 0,05$) je manji u odnosu na vrijednost trombocita kontrolne skupine.

Vrijednosti eritrocitnih konstanti u nijednoj skupini se nisu značajno promijenili.

Tablica 4. Hematološke i imunodne odrednice miševa s Erlichovim ascitesnim tumorom nakon preventivne intraperitonejske imunoterapije propolisom te kemoterapije cisplatinom s istovremenom hipertermijom

Skupina Preventivna obrada 43°C^a		Kontrola	Cispl. 5 mg kg^{-1}	Cispl. 5 mg kg^{-1} + VOP	Cispl. 10 mg kg^{-1}	Cispl. 10 mg kg^{-1} + VOP
Hematološki parametri 10. dan nakon <i>i.p.</i> unosa EAT stanica (2×10^6) (S.V. \pm S.D.)	Leukociti ($\times 10^9 \text{ L}^{-1}$)	12.25 ± 2.59	14.84 ± 2.34	9.40 ± 2.18	8.55 ± 0.90	10.77 ± 2.43
	Polimorfo-nuklearni leukociti (%)	62.34 ± 7.97	55.01 ± 6.77	$37.44 \pm 1.25^{*\diamond}$	$46.17 \pm 4.58^*$	46.37 ± 13.01
	Mono-nuklearni leukociti (%)	37.69 ± 7.99	44.99 ± 6.77	$62.58 \pm 1.32^{*\diamond}$	$53.83 \pm 4.58^*$	53.62 ± 12.97
	Eritrociti ($\times 10^{12} \text{ L}^{-1}$)	9.50 ± 0.24	$8.07 \pm 0.69^*$	$8.66 \pm 0.39^*$	8.54 ± 0.96	9.45 ± 0.40
	Hemoglobin (g L^{-1})	139.45 ± 3.21	$124.25 \pm 5.89^*$	$130.67 \pm 5.13^*$	124.95 ± 10.08	136.95 ± 6.23
	Hematokrit (L L^{-1})	0.46 ± 0.01	$0.40 \pm 0.02^*$	0.42 ± 0.03	$0.41 \pm 0.03^*$	0.44 ± 0.02
	MCV (f L)	96.95 ± 0.76	100.30 ± 5.13	97.73 ± 3.87	95.15 ± 2.84	$93.55 \pm 1.96^*$
	MCH (p g)	29.40 ± 0.28	30.90 ± 1.67	30.20 ± 0.92	29.40 ± 1.14	29.00 ± 1.19
	MCHC (g L^{-1})	606.50 ± 8.23	616.00 ± 9.93	618.00 ± 15.87	617.50 ± 6.81	620.50 ± 13.30
	Trombociti ($\times 10^{12} \text{ L}^{-1}$)	2077.50 ± 196.15	1648.00 ± 267.10	1762.00 ± 128.51	1879.33 ± 73.38	$1523.50 \pm 278.38^*$

^a Životinje su preventivno obrađene s VOP-a 7. i 3. dana (50 mg kg^{-1}) prije *i.p.* unosa EAT stanica (2×10^6). Cisplatina je primijenjena *i.p.* (5 i 10 mg kg^{-1}) uz istovremenu intraperitonejsku hipertermiju 3. dana nakon *i.p.* unosa EAT stanica.

* Statistički značajno ($p < 0.05$) u odnosu na kontrolnu skupinu (Student test).

\diamond Statistički značajno ($p < 0.05$) u odnosu na skupinu Cisplatin 5 mg kg^{-1} (Student test).

Skupina sadržava 4 životinje.

Deseti dan nakon *i.p.* unosa EAT stanica (2×10^6), te nakon preventivne intraperitonejske imunoterapije propolisom i kemoterapije cisplatinom s istovremenom hipertermijom (43°C), broj leukocita i dalje se nije mijenjao u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 4).

Značajno smanjen broj eritrocita, hemoglobina i hematokrita ($p < 0,05$) zapažen je u skupini miševa obrađenoj Cisplatinom (5 mg kg^{-1}) u odnosu na kontrolnu skupinu.

Postotak polimorfonuklearnih leukocita (37.44 ± 1.25) u skupini Cisplatina 5 mg kg^{-1} + VOP je statistički značajno ($p < 0,05$) smanjen u odnosu na vrijednost polimorfonuklearnih leukocita kontrolne skupine i u odnosu na skupinu miševa obrađenu samo s Cisplatinom u dozi od 5 mg kg^{-1} . Vrijednost mononuklearnih leukocita u skupini Cisplatina 5 mg kg^{-1} + VOP je statistički značajno ($p < 0,05$) veći u odnosu na kontrolnu skupinu i skupinu obrađenu s Cisplatinom (5 mg kg^{-1}). Broj eritrocita i koncentracija hemoglobina su statistički značajno smanjeni u skupini Cisplatina 5 mg kg^{-1} + VOP u odnosu na kontrolnu skupinu.

Postotak polimorfonuklearnih leukocita u skupini obrađenoj Cisplatinom (10 mg kg^{-1}) je bio statički značajno smanjen dok je broj mononuklearnih leukocita bio povećan ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu. Koncentracija hematokrita iste skupine je značajno ($p < 0,05$) smanjena u odnosu na kontrolnu skupinu. MCV vrijednost i broj trombocita u skupini obrađenoj Cisplatinom u dozi od 10 mg kg^{-1} i VOP bili su statički značajno smanjeni u odnosu na kontrolnu skupinu.

Tablica 5. Hematološke i imunosne odrednice miševa s Erlichovim ascitesnim tumorom nakon preventivne intraperitonejske imunoterapije propolisom te kemoterapije cisplatinom

Skupina Preventivna obrada 37°C ^a		Kontrola	VOP	Cispl. 5 mg kg ⁻¹	Cispl. 5 mg kg ⁻¹ + VOP	Cispl. 10 mg kg ⁻¹	Cispl. 10 mg kg ⁻¹ + VOP
Hematološki parametri 17. dan nakon <i>i.p.</i> unosa EAT stanica (2×10 ⁶) (S.V. ± S.D.)	Leukociti (×10 ⁹ L ⁻¹)	30.13 ± 19.78	36.09 ± 18.78	15.53 ± 9.09	14.41 ± 4.80	7.46 ± 2.21	8.52 ± 2.00
	Polimorfo-nuklearni leukociti (%)	57.67 ± 22.89	44.07 ± 46.75	59.85 ± 27.42	46.08 ± 21.42	31.19 ± 1.27	16.91 ± 5.65* [•]
	Mono-nuklearni leukociti (%)	42.34 ± 22.95	55.93 ± 46.74	40.16 ± 27.44	53.93 ± 21.42	68.85 ± 1.27	83.10 ± 5.61* [•]
	Eritrociti (×10 ¹² L ⁻¹)	4.48 ± 0.86	3.68 ± 1.59	8.74 ± 0.35*	8.35 ± 1.32*	8.81 ± 0.44*	9.18 ± 0.65*
	Hemoglobin (g L ⁻¹)	67.25 ± 8.99	62.00 ± 18.16	130.70 ± 10.47*	118.33 ± 17.98*	127.30 ± 6.93*	134.15 ± 8.12*
	Hematokrit (L L ⁻¹)	0.24 ± 0.03	0.21 ± 0.06	0.45 ± 0.02*	0.40 ± 0.07*	0.43 ± 0.02*	0.45 ± 0.02*
	MCV (f L)	276.13 ± 24.17	118.70 ± 14.65*	102.60 ± 3.62*	96.73 ± 3.31*	97.80 ± 0.85*	98.60 ± 1.93*
	MCH (p g)	75.88 ± 6.45	34.85 ± 4.09*	29.90 ± 1.75*	28.40 ± 0.87*	28.90 ± 0.14*	29.30 ± 0.53*
	MCHC (g L ⁻¹)	1375.00 ± 45.28	588.50 ± 20.55*	582.50 ± 16.76*	586.00 ± 8.00*	591.00 ± 1.41*	594.00 ± 5.42*
	Trombociti (×10 ¹² L ⁻¹)	2056.25 ± 603.37	1413.00 ± 180.17	1384.50 ± 308.53	1209.33 ± 232.18	1295.00 ± 397.39	1342.00 ± 393.25

^a Životinje su preventivno obrađene s VOP-a 7. i 3. dana (50 mg kg⁻¹) prije *i.p.* unosa EAT stanica (2×10⁶). Cisplatina je primijenjena *i.p.* (5 i 10 mg kg⁻¹) 3. dana nakon *i.p.* unosa EAT stanica.

* Statistički značajno (p<0.05) u odnosu na kontrolnu skupinu (Student test).

• Statistički značajno (p<0.05) u odnosu na skupinu Cisplatin 10 mg kg⁻¹ (Student test).

Skupina sadržava 4 životinje.

Sedamnesti dan nakon *i.p.* unosa EAT stanica (2×10⁶), te nakon preventivne intraperitonejske imunoterapije propolisom i kemoterapije cisplatinom došlo je do značajnih promjena u svim skupinama i u gotovo svim hematološkim parametrima (Tablica 5). Broj leukocita i trombocita niti u jednoj skupini nije bio statistički značajno promijenjen. Postotci polimorfonuklearnih i mononuklearnih leukocita značajno (p<0,05) su se promijenili u skupini obrađenoj s Cisplatin 10 mg kg⁻¹ i VOP-a.

Broj eritrocita te koncentracije hemoglobina i hematokrita značajno (p<0,05) su se povećale u skupinama Cisplatin 5 mg kg⁻¹, Cisplatin 5 mg kg⁻¹ + VOP, Cisplatin 10 mg kg⁻¹ i

Cisplatin 10 mg kg⁻¹ + VOP u odnosu na kontrolnu skupinu dok se u skupini VOP njihove vrijednosti nisu značajno promijenile.

Eritrocitne konstante (MCV, MCH, MCHC) su se u svim skupinama (VOP, Cisplatin 5 mg kg⁻¹, Cisplatin 5 mg kg⁻¹ + VOP, Cisplatin 10 mg kg⁻¹ i Cisplatin 10 mg kg⁻¹ + VOP) statistički značajne smanjile, s obzirom na kontrolne skupine.

Tablica 6. Hematološke i imunosne odrednice miševa s Erlichovim ascitesnim tumorom nakon preventivne intraperitonejske imunoterapije propolisom te kemoterapije cisplatinom s istovremenom hipertermijom

Skupina Preventivna obrada 43°C ^a		Kontrola	Cispl. 5 mg kg ⁻¹	Cispl. 5 mg kg ⁻¹ + VOP	Cispl. 10 mg kg ⁻¹	Cispl. 10 mg kg ⁻¹ + VOP
Hematološki parametri 17. dan nakon <i>i.p.</i> unosa EAT stanica (2×10 ⁶) (S.V. ± S.D.)	Leukociti (×10 ⁹ L ⁻¹)	30.13 ± 19.78	12.78 ± 4.86	8.23 ± 1.85	8.89 ± 4.19	7.16 ± 1.53
	Polimorfo-nuklearni leukociti (%)	57.67 ± 22.89	51.35 ± 22.60	28.88 ± 3.42	42.12 ± 11.51	15.28 ± 2.40* [•]
	Mono-nuklearni leukociti (%)	42.34 ± 22.95	48.64 ± 22.63	71.11 ± 3.39	57.86 ± 11.49	84.71 ± 2.41* [•]
	Eritrociti (×10 ¹² L ⁻¹)	4.48 ± 0.86	7.10 ± 0.95*	8.73 ± 0.76* [♦]	8.83 ± 0.33*	8.98 ± 0.37*
	Hemoglobin (g L ⁻¹)	67.25 ± 8.99	100.00 ± 13.71*	120.88 ± 9.84* [♦]	120.00 ± 12.49*	124.38 ± 2.75*
	Hematokrit (L L ⁻¹)	0.24 ± 0.03	0.35 ± 0.04*	0.42 ± 0.03* [♦]	0.43 ± 0.02*	0.43 ± 0.01*
	MCV (f L)	276.13 ± 24.17	246.38 ± 7.58	240.88 ± 3.20	251.25 ± 21.78	238.75 ± 3.93
	MCH (p g)	75.88 ± 6.45	70.38 ± 1.03	69.25 ± 0.87	69.00 ± 4.60	69.25 ± 2.40
	MCHC (g L ⁻¹)	1375.00 ± 45.28	1430.00 ± 36.29	1437.50 ± 10.41	1375.00 ± 91.20	1451.25 ± 36.37*
	Trombociti (×10 ¹² L ⁻¹)	2056.25 ± 603.37	1501.25 ± 127.57	1458.75 ± 167.05	1281.25 ± 451.01	1098.75 ± 61.42

^a Životinje su preventivno obrađene s VOP-a. 7. i 3. dana (50 mg kg⁻¹) prije *i.p.* unosa EAT stanica (2×10⁶). Cisplatina je primijenjena *i.p.* (5 i 10 mg kg⁻¹) uz istovremenu intraperitonejsku hipertermiju 3. dana nakon *i.p.* unosa EAT stanica.

* Statistički značajno (p<0.05) u odnosu na kontrolnu skupinu (Student test).

♦ Statistički značajno (p<0.05) u odnosu na skupinu Cisplatin 5 mg kg⁻¹ (Student test).

• Statistički značajno (p<0.05) u odnosu na skupinu Cisplatin 10 mg kg⁻¹ (Student test).

Skupina sadržava 4 životinje.

Sedamnaesti dan nakon nakon *i.p.* unosa EAT stanica (2×10^6), te nakon preventivne intraperitonejske imunoterapije propolisom i kemoterapije cisplatinom s istovremenom hipertermijom, broj leukocita se nije statički značajno promijenio ni u jednoj skupini (Tablica 6.)

Postotak polimorfonuklearnih i mononuklearnih leukocita statistički je značajno promijenjen samo u skupini Cisplatin 10 mg kg⁻¹ + VOP, u odnosu na kontrolu i odnosu na skupinu obrađenu Cisplatin 10 mg kg⁻¹.

Broj eritrocita te koncentracija hemoglobina i hematokrita značajno ($p < 0,05$) su se povećali u svim skupinama (Cisplatin 5 mg kg⁻¹, Cisplatin 5 mg kg⁻¹ + VOP, Cisplatin 10 mg kg⁻¹ i Cisplatin 10 mg kg⁻¹ + VOP) u odnosu na kontrolnu skupinu. Broj eritrocita i koncentracija hemoglobina i hematokrita skupine Cisplatin 5 mg kg⁻¹ + VOP, osim u odnosu na kontrolu povećali su se i u odnosu na skupinu Cisplatin 5 mg kg⁻¹.

Eritrocitne konstante (MCV, MCH, MCHC) nisu bile niti u jednoj skupini bitno promijenjene, osim u skupini koja je obrađena sa Cisplatin 10 mg kg⁻¹ i VOP-a gdje je vrijednost MCHC veća nego u kontrolnoj skupini.

Broj trombocita se ni u jednoj skupini nije statistički značajno promijenio.

5. RASPRAVA

Stimulacija imunološkog sustava u obrani domaćina protiv tumora (posebice, u slabo imunogeničnih tumora) danas je najčešće rabljeni oblik liječenja združena s drugim načinima liječenja (kemoterapija, zračenje i dr.). Stoga smo istražili učinak vodene otopine propolisa združen s citostatikom cisplatinom na rast tumora, posebice hematološke i imunosne odrednice u miša. Kemoterapija prouzrokuje leukopeniju vodeći značajnom morbiditetu i smrtnosti; glavni je ograničavajući čimbenik u kliničkoj kemoterapiji bez učinkovitog liječenja. Kako tumor raste progresivno, imunosni sustav miševa-nositelja tumora je stalno oslabljen i oštećen (Oršolić i Bašić, 2007). Naša prijašnja istraživanja su pokazala da vodena otopina propolisa može ublažiti inhibitorni učinak na limfocite prouzročen kemoterapeutcima (Oršolić i sur. 2008).

Usporedivši rezultate iz prethodnih tablica možemo primjetiti da se nakon preventivne intraperitonejske imunoterapije propolisom te kemoterapije cisplatinom sa hipertermijom, ukupan broj leukocita gotovo nigdje nije promijenio u odnosu na kontrolu. Čak ni u onim skupinama koje su bile obrađene samo cisplatinom (5 mg kg^{-1} i 10 mg kg^{-1}). S obzirom da citostatik cisplatina izaziva imunosupresiju očekivali bi da će se u tim skupinama njihov broj smanjiti kao što je dobiveno u istraživanju (Oršolić i sur., 2008) gdje se broj leukocita smanjio u skupini koja je obrađena samo s kemoterapeutikom epirubicinom ili sa doksorubicinom. Skupine koje su bile obrađene s navedenim citostaticima u kombinaciji sa vodenom otopinom propolisa bilježile su porast broja leukocita. U našem istraživanju pad broja leukocita zabilježen je samo 3. dan pri 37°C u skupini koja je obrađena cisplatinom (10 mg kg^{-1}) i vodenom otopinom propolisa što pripisujemo imunosupresiji, a također možemo zaključiti da vodena otopina propolisa pri visokim dozama citostatika nije imala jaki zaštitni učinak na stanice. Sljedeće odstupanje primjećeno je još i 10. dan pri 37°C gdje je zabilježen rast broja leukocita u skupini obrađenoj samo vodenom otopinom propolisa što je u skladu sa rezultatima nekih istraživanja (Oršolić i sur., 2008; Oršolić i Bašić, 2005.). Možemo također primjetiti da ni hipertermija nije utjecala na promjenu broja imunosnih odrednica, osim blagog porasta mononukleara 3. dana, a 10. i 17. dana porast je bio značajan u skupinama obrađenim VOP-om i cisplatinom. Broj mononukleara se povećava s vremenom i u skupinama bez hipertermije što ukazuje na upalni proces prouzročen nazočnošću tumora i brojnih stanica koje sudjeluju u imunosnoj reakciji na tumor te njihovim toksičnim

metabolitima i citokinima. Naši rezultati pokazuju da je odnos broja mononukleara i polimorfonukleara promijenjen kod skupine miševa obrađene VOP-om što ukazuje na brzo propadanje neutrofila kao najbrojnijih polimorfonuklearnih stanica uslijed nepovoljnih uvjeta okoliša posljedično nastalih povećanim brojem makrofaga, njihovih citokina, enzima i toksičnih radikala. Okoliš aktiviranih makrofaga može biti toksičan zbog metaboličke aktivnosti istih, kiselosti sredine, smanjene količine O_2 , nazočnosti H_2O_2 , lizosomalnih enzima i dušikovog oksida (NO) (Oršolić i Bašić, 2003) što je vjerojatno glavni uzrok smrti ciljnih stanica posredovane makrofagima. Poznato je da su makrofagi znatno otporniji i mogu znatno duže preživjeti u nepovoljnim uvjetima te stoga predstavljaju prvu i zadnju liniju obrane organizma od nepoželjnih antigena.

Čini se da vodena otopina propolisa data nositeljima tumora nije bitno utjecala na njihove hematološke parametre ali je zasigurno stimulirala makrofage a preko njih i druge imunosne stanice (T, B i NK) s obzirom da životinje obrađene VOP-om i citostatikom su znatno duže preživjele u usporedbi s kontrolnom skupinom. Poznato je da nazočnost tumora vodi disfunkciji imunološkog sustava domaćina (Elgert i sur. 1998). Objašnjenje neučinkovitosti propolisa na znatne promjene u hematološkim i imunosnim odrednicama nositelja tumora može biti posljedica proizvodnje različitih molekula koje stvaraju tumorske stanice tijekom rasta tumora [primjerice, IL-4, IL-6, IL-10, čimbenika deaktivacije makrofaga (engl. macrophage deactivating factor), čimbenika transformacije rasta (engl. transforming growth factor, $TGF-\beta_1$), prostaglandina E_2 (PGE_2), i čimbenika stimuliranja kolonija makrofaga (engl. macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)] na aktivirane makrofage, a preko njih i na broj leukocitnih stanica. Elgert i sur. (1998) pokazuju da ove molekule koje luči tumor deaktiviraju ili suprimiraju citotoksičnu aktivnost aktiviranih makrofaga. Tako nazočnost tumora u organizmu mijenja aktivnost makrofaga u različitim odjeljcima organizma; primjerice deaktivirani su makrofagi u tumorskom tkivu, dok su istodobno aktivirani makrofagi okolnog tkiva, tako da dvostruko djeluju na protutumorski imunološki odgovor domaćina.

Tako se broj eritrocita 3. dan (pri 37 °C i pri hipertermiji) nakon preventivne intraperitonejske imunoterapije propolisom te kemoterapije cisplatinom, u nijednoj skupini nije promijenio u odnosu na kontrolu što možemo pripisati kratkotrajnom djelovanju kemoterapije. Smanjeni broj eritrocita primjećen je 10. dan pri 37 °C u skupinama obrađene vodenom otopinom propolisa, obrađene cisplatinom (5 mg kg^{-1}) i VOP-a i u skupini obrađene

cisplatinom (10 mg kg^{-1}) i VOP-a što ukazuje na pojavu anemije uzrokovanu oštećenjem koštane srži cisplatinom. No osim broja eritrocita u istim skupinama je i zabilježen pad koncentracije hemoglobina i hematokrita. Možemo primjetiti da su lošiji rezultati upravo dobiveni u skupinama za koje to nismo očekivali tj. u skupinama koje su osim cisplatine (5 mg kg^{-1} i 10 mg kg^{-1}) obrađene i vodenom otopinom propolisa što nije u skladu s očekivanim rezultatima. Naime, u sličnim istraživanjima (Oršolić *et al.*, 2008) zabilježeno je da je broj eritrocita pao u skupinama obrađenim samo cisplatinom, dok se u skupini koja je bila obrađena združenim djelovanjem cisplatine i vodenom otopinom propolisa broj eritrocita povećao. Razlozi tim negativnim rezultatima može taj što smo koristili mali broj uzoraka što je nedovoljno da bi dobili vjerodostojne rezultate, te je način obrade bio drugačiji (3 dana u nizu) a ovdje 7. i 3. dana prije unosa citostatika. Iz dobivenih rezultata čini se da je VOP potaknuo hematopoezu tako da je djelovanje cisplatine pogodilo eritrocite u njihovoj najranijoj fazi sazrijevanja što je za njih bilo pogubno. Ista pojava (za eritrocite i hemoglobin) je primjećena uz hipertermiju kod istog dana, ali kod drugih skupina tj. skupine obrađene cisplatinom (5 mg kg^{-1}) i skupine obrađene cisplatinom (5 mg kg^{-1}) obrađene s vodenom otopinom propolisa. Ovaj rezultat smatramo neočekivanim s obzirom da bi citotoksičnost cisplatine trebala biti veća pri većoj dozi, naročito uz hipertermiju što u ovom istraživanju nije dobiveno što možda ukazuje da su promjene se događale samo lokalno (u trbušnoj šupljini) a ne u krvi. Sljedeće promjene zbile su se 17. dan pri 37°C gdje je zabilježen porast broja eritrocita te koncentracije hemoglobina i hematokrita u svim skupinama tj. u onima gdje je samo cisplatina (veća i manja doza), te u onima gdje združeno djeluje cisplatina i vodena otopina propolisa. Ovi rezultati ukazuju da je došlo do pojačanog stvaranja čimbenika stimulacije eritropoeze, vjerojatno zbog kratkotrajne hipoksije prouzročene padom eritrocita i smanjenom sintezom hemoglobina te narušenom hematopoezom nazočnošću tumora i kemoterapijom što je posljedično prouzročilo pojačanu izlučivanje eritropoetina i drugi čimbenika posebice čimbenika koji stimulira rast kolonija makrofaga i granulocita (GM-CSF) te potiče razvoj hematopoeze i mijelopoeze.

Da je došlo do poremećaja sinteze hemoglobina ukazuju i niže vrijednosti MCV i MCH od kontrolnih vrijednosti u svim skupinama što vodi zaključku da se radi o mikrocitnoj hipokromnoj anemiji.

Ono što još možemo istaknuti je smanjen broj trombocita 3. dan pri 37°C u skupini koje su obrađene samo vodenom otopinom propolisa i u skupini koja je obrađena cisplatinom (5 mg kg^{-1}) i vodenom otopinom propolisa zajedno. Smanjenje se također dogodilo i pri

hipertermiji istog dana u skupinama cisplatine (manja i veća doza) sa vodenom otopinom propolisa, zatim 10. dan pri 37 °C u skupini cisplatine (10 mg kg⁻¹) i u skupini iste cisplatine sa propolisom te na kraju iste skupine, ali pri hipertermiji istog dana. Ovi rezultati su u skladu s drugima da VOP-a ima antitrombocitni učinak što je posebice važno u nazočnosti tumora. Naime, kada se nađu u krvnom optjecaju tumorske stanice stvaraju embrole nakupljanjem i pričvršćenjem za trombocite te na taj način budu donekle zaštićene od djelovanja antitumorskih stanica domaćina. Stoga je smanjena količina trombocita za organizam povoljnija jer se time onemogućava zaštita tumorskih stanica od uništenja.

Prema navedenim podacima očito je da postoje brojne međureakcije između imunosnih, hematopoetskih i tumorskih stanica. Ipak znatno povećano preživljenje životinja obrađenih VOP-om i citostatikom ukazuje da propolis i njegove flavonoidne sastavnice mogu smanjiti posljedice toksičnosti citostatika te pojačati stimulaciju imunosnih stanica koje uspravaju rast tumora, vode njegovom odbacivanju, uništenju i povećavaju preživljenje domaćina. Brojni podaci ukazuju da različite hranidbene tvari, biljna hrana koja sadrži polifenole kao što su flavonoidi, folne kiseline i druge sastavnice pokazuju brojne biološke aktivnosti uključene u terapiju tumora (Kuhlmann i sur., 2003; Lee i sur., 2003; Choi i sur., 2004; Oršolić i Bašić, 2005; Oršolić i sur., 2006; Nadova i sur., 2007). Prema tome možemo zaključiti da propolis i njegove flavonoidne sastavnice združeni s kemoterapeuticima mogu povećati protutumorski učinak kemoterapeutika što sugerira moguću kliničku uporabu u cilju povećanja imunosti organizma te smanjenja štetnih učinaka kemoterapeutika na normalne stanice i tkiva.

6. ZAKLJUČCI

Temeljem istraživanja učinaka hipertermije, citostatika cisplatine i propolisa na imunosne odrednice u miša nositelja Erlichovog ascitesnog tumora možemo zaključiti:

1. Propolis i njegove polifenolne sastavnice mogu modulirati imunosni odgovor miša nositelja-tumora.
2. Protutumorski učinak vodenih propolisa temelji se na aktivaciji makrofaga, povećanju njihovih litičkih sposobnosti na stanice tumora te na proizvodnju topivih čimbenika koji sudjeluju u regulaciji aktivnosti drugih imunosnih stanica.
3. Obrada životinja s cisplatinom u kombinaciji s hipertermijom znatno povećava preživljavanje životinja, ali ne prouzrokuje značajne promjene u imunosnim i hematopoetskim odrednicama u odnosu na obradu bez hipertermije.
4. Dobiveni rezultati ukazuju da su propolis i njegove polifenolne sastavnice izraziti stimulatori imunosnog odgovora i hematopoeze što je izuzetno važno s obzirom na hematotoksičnost i mijelosupresiju prouzročenu cisplatinom.
5. Nazočnost tumora te obrada životinja cisplatinom i hipertermijom prouzročili su poremećaje u sintezi hemoglobina na što ukazuju niže vrijednosti MCV i MCH obrađenih životinja u odnosu na kontrolne životinje.
6. Pripravak propolisa (VOP) stimulira hematopoetske i imunomodulacijske mehanizme, omogućuje pojačanu otpornost na infekcije nakon obrade cisplatinom te pospješuje oporavak i preživljenje životinja.
7. Obrada propolisom i njegovim flavonoidnim sastavnicama može smanjiti posljedice toksičnosti citostatika te pojačati stimulaciju imunosnih stanica koje uspravaju rast tumora, vode njegovom odbacivanju, uništenju i povećavaju preživljenje domaćina.

7. LITERATURA

Bašić M., Malenica B., Eljuga D. (1996): Biologija metastaziranja tumora. U: Turić M., Kolarić K., Eljuga D. Klinička onkologija. Nakladni zavod Globus, Zagreb, str. 99 – 106.

Hausmann R.E., Cooper G.M. (2004): Rak. U: Hausmann R.E., Cooper G.M. Stanica – molekularni pristup. Medicinska naklada, Zagreb, str. 631 – 673.

Labar B., Hauptmann E. i suradnici (1998): Anemije. U: Labar B., Hauptmann E. i suradnici Hematologija. Školska knjiga, Zagreb, str. 111 – 140.

Labar B., Hauptmann E. i suradnici (1998): Hematopoetski sustav. U: Labar B., Hauptmann E. i suradnici Hematologija. Školska knjiga, Zagreb, str. 3 – 6.

Kumar V., Cotran., Robbins S.L. (2000) : Novotvorine. U: Kumar V., Cotran., Robbins S.L. Osnove patologije – prema petom američkom izdanju, Školska knjiga, Zagreb, str.171 – 215.

Malenica B., Bašić I. (1996): Imunobiološka utemeljenost i pristupi imunoterapiji (bioterapiji) raka. U: Turić M., Kolarić K., Eljuga D. Klinička onkologija. Nakladni zavod Globus, Zagreb, str. 236 – 248.

Pavelić K. (2004): Molekularno – genetička osnova raka. U: Šamija M. i suradnici Onkologija. Medicinska naklada, Zagreb, str. 19 – 20.

Radačić M. (1996): Termoterapija i fototerapija tumora. U: Turić M., Kolarić K., Eljuga D. Klinička onkologija. Nakladni zavod Globus, Zagreb, str. 250 – 259.

Radić S. (2004): Propolis – lijek 21. stoljeća? Grafform, Split.

Roth A. (1996): Načela kemoterapije. U: Turić M., Kolarić K., Eljuga D. Klinička onkologija. Nakladni zavod Globus, Zagreb, str. 209 – 221.

Taradi M. (2004.): Imunoreakcija na tumor. U: Andreis I., Batinić D., Čulo F., Grčević D., Marušić M., Višnjić D. Imunologija. Medicinska naklada, Zagreb, str. 313 – 333.

Tomek R. (2004): Sistemska liječenje tumora. U: Šamija M. i suradnici Onkologija. Medicinska naklada, Zagreb, str. 172 – 177.

Choi YH., Choi HK., Peltenburg – Looman AM., Lefeber AW., Verpoorte R. (2004): Quantitative analysis of ginkgolic acids from Ginkgo leaves and products using ¹H-NMR. *Phytochem Anal.* **15**(5): 325-30.

Elgert KD., Alleva DG., Mullins DW. (1998): Tumor – induced immune dysfunction: the macrophage connection. *J Leukoc Biol.* **64**(3): 275-90.

Kuhlmann O., Hofmann HS., Muller SP., Weiss M. (2003): Pharmacokinetics of idarubicin in the isolated perfused rat lung: effect of cinchonine and rutin. *Anticancer Drugs* **14**(6): 411-416.

Lee JC., Kim J., Park JK., Chung GH., Jang YS. (2003): The antioxidant, rather than prooxidant, activities of quercetin on normal cells: quercetin protects mouse thymocytes from glucose oxidase-mediated apoptosis. *Exp Cell Res* **291**(2): 386-397.

Nadova S., Miadokova E., Cipak L. (2007): Flavonoids potentiate the efficacy of cytarabine through modulation of drug – induced apoptosis. *Neoplasma.* **54**(3): 202-6.

Nikolov N., Marekov N., Bankova V., Popov., Ignatova R., Vladimirova I. (1987): Method for the preparation of water – soluble derivative of propolis. *Bulgarian Journal of Patology Applied* 79903/28, 05

Oršolić N., Bašić I. (2005): Antitumor, hematostimulative and radioprotective action of water-soluble derivative of propolis (WSDP). *Biomed. Pharmacother.* **59**: 561 – 571.

Oršolić N., Bašić I. (2007): Cancer chemoprevention by propolis and its polyphenolic compounds in experimental animals. *Phytochemistry and Pharmacology III*, (Editor: V. K. Singh, J. N. Govil & C. Arunachalam, STUDIUM PRESS, LLC, U.S.A). *Recent Progress in Medicinal Plants* **17**: 55-114.

Oršolić N., Bašić I. (2003): Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis (WSDP) a factor of antitumor reactivity. *Journal of Ethnopharmacology.* **84**: 265-273.

Oršolić N., Horvat – Knežević A., Benković V., Bašić I. (2008): Benefits of use of propolis and related flavonoids against the toxicity of chemotherapeutic agents. *Transworld Research Network.* 195 – 222.

Oršolić N., Tadić Z., Benković V., Horvat – Knežević A., Lisičić D., Bašić I. (2006): Stimulation of hematopoiesis by a water – soluble derivative of propolis in mice. Pharmacologyonline **3**: 698-705.

<http://www.stomportal.com/hr/diplomskiradovi/propolis.html>

<http://www.zdravlje.hr/clanak.php?id=12982>